



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117915927 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 19

(21) 申请号 202280041765.2

(22) 申请日 2022.04.20

(30) 优先权数据

63/177,956 2021.04.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/025651 2022.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/226130 EN 2022.10.27

(71) 申请人 因达普塔治疗公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 G·迪皮耶罗 A·比格利

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书6页 说明书96页

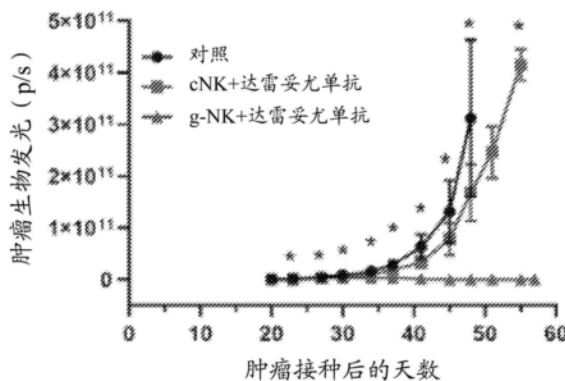
序列表6页 附图65页

(54) 发明名称

自然杀伤细胞组合物的治疗和给药方法

(57) 摘要

本文提供了涉及给药含有NK细胞的组合物的治疗方法和用途。所提供的方法和用途是用于治疗癌症(诸如多发性骨髓瘤或淋巴瘤)的方法和用途,包括与治疗该癌症的抗体组合。



1. 一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法是没有组合施用用于治疗所述多发性骨髓瘤的外源性抗体的单一疗法。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用针对多发性骨髓瘤抗原的抗体。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述多发性骨髓瘤抗原包含选自CD38、SLAMF7和BCMA的抗原。
5. 根据权利要求3或权利要求4所述的方法,其中所述抗体是全长抗体。
6. 根据权利要求3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗SLAMF7抗体。
7. 根据权利要求3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗BCMA抗体。
8. 根据权利要求3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD38抗体。
9. 根据权利要求3所述的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16以及选自BCMA、SLAMF7和CD38的第二多发性骨髓瘤抗原。
11. 根据权利要求9或权利要求10所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16和CD38。
12. 根据权利要求3至11中任一项所述的方法,其中所述抗体每四周施用一次、每三周施用一次、每两周施用一次、每周施用一次或每周两次。
13. 根据权利要求8所述的方法,其中在施用一个剂量的所述g-NK细胞组合物之前,已经向所述受试者施用了至少一个剂量的抗CD38抗体。
14. 一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中所述受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD38抗体的施用。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物在14天周期中以两个剂量施用,其中所述14天周期重复一至三次。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物作为六个总剂量施用。
17. 根据权利要求8和13至16中任一项所述的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗。
18. 根据权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的一个月内开始。
19. 根据权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的三周内开始。
20. 根据权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的两周内开始。
21. 根据权利要求8和13至20中任一项所述的方法,其中所述抗CD38抗体是静脉内施

用。

22. 根据权利要求8和13至21中任一项所述的方法,其中所述抗CD38抗体以每周一次剂量施用,任选地持续一个或两个28天周期。

23. 根据权利要求8和13至22中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)以为或为约8mg/kg至约32mg/kg的量施用,任选地为或为约16mg/kg。

24. 根据权利要求8和13至20中任一项所述的方法,其中所述抗CD38抗体是皮下施用。

25. 根据权利要求8、13至20和24中任一项所述的方法,其中所述抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)以包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物施用,任选地其中所述抗CD38抗体组合物包括达雷妥尤单抗和重组人透明质酸酶PH20(例如,透明质酸酶-fihj)。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述抗CD38抗体组合物以每周一次剂量施用,任选地持续一个或两个28天周期。

27. 根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD38抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。

28. 根据权利要求24至27中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD38抗体组合物包括约1800mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和约30,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。

29. 根据权利要求8和13至28中任一项所述的方法,其中所述方法包括每周一次施用所述抗CD38抗体、任选地所述抗CD38抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用所述g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的所述组合物之前施用一个剂量或两个剂量的所述抗CD38抗体。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述多发性骨髓瘤是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞具有低CD38表达或没有所述表达,任选地其中所述g-NK细胞组合物中少于25%的所述细胞对表面CD38呈阳性。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物中的所述细胞未被工程化以减少或消除CD38表达。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物表现出最小的抗CD38诱导的同种相杀,任选地其中所述g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗CD38诱导的同种相杀。

34. 一种治疗淋巴瘤的方法,所述方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述方法是没有组合施用用于治疗所述淋巴瘤的外源性抗体的单一疗法。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用针对淋巴瘤抗原的抗体。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述淋巴瘤抗原包含选自CD19、CD20和CD30的抗原。

38. 根据权利要求36或权利要求37所述的方法,其中所述抗体是全长抗体。
39. 根据权利要求36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD19抗体。
40. 根据权利要求36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD30抗体。
41. 根据权利要求36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD20抗体。
42. 根据权利要求36所述的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。
43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16以及选自CD19、CD20和CD30的第二抗原。
44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16和CD20。
45. 根据权利要求36至44所述的方法,其中所述抗体每四周施用一次、每三周施用一次、每两周施用一次、每周施用一次或每周两次。
46. 根据权利要求41所述的方法,其中在施用一个剂量的所述g-NK细胞组合物之前,已经向所述受试者施用了至少一个剂量的抗CD20抗体。
47. 一种治疗淋巴瘤的方法,所述方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中所述受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD20抗体的施用。
48. 根据权利要求34至47中任一项所述的方法,其中所述淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。
49. 根据权利要求34至48中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物在14天周期中以两个剂量施用,其中所述14天周期重复一至三次。
50. 根据权利要求34至49中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物作为六个总剂量施用。
51. 根据权利要求41和45至50中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗。
52. 根据权利要求41和45至51中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的一个月开始。
53. 根据权利要求41和45至52中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的三周内开始。
54. 根据权利要求41和45至53中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的两周内开始。
55. 根据权利要求41和45至54中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是静脉内施用。
56. 根据权利要求41和45至55中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体以每周一次剂量施用,任选地施用4或8个剂量。
57. 根据权利要求41和45至56中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体以为或为约250mg/m²至500mg/m²的量施用,任选地为或为约375mg/m²。
58. 根据权利要求41和45至54中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是皮下施用。
59. 根据权利要求41、45至54和58中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)以包括透明质酸酶的抗CD20抗体组合物施用,任选地其中所述抗CD20抗体组合

物包括利妥昔单抗和人重组透明质酸酶PH20。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述抗CD20抗体组合物作为每周一次剂量静脉内施用,任选地在每周一次剂量的所述抗CD20抗体后施用4或8个剂量或任选地3或7个剂量。

61. 根据权利要求59或权利要求60所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶。

62. 根据权利要求59至61中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括约1400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约23,400U透明酯酸酶。

63. 根据权利要求59至61中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括约1600mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约26,800U透明酯酸酶。

64. 根据权利要求41和45至63中任一项所述的方法,其中所述方法包括每周一次施用所述抗CD20抗体、任选地所述抗CD20抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用所述g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的所述组合物之前施用一个剂量或两个剂量的所述抗CD20抗体。

65. 根据权利要求1至64中任一项所述的方法,其中在所述g-NK细胞组合物中的细胞中,大于为或为约60%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约70%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约80%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约90%的所述细胞是g-NK细胞,或者大于为或为约95%的所述细胞是g-NK细胞。

66. 根据权利要求1至64中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物中至少为或为约50%的所述细胞是FcR γ -缺陷型(FcR $\gamma^{\text{阴性}}$)NK细胞(g-NK),其中大于为或为约70%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约70%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

67. 根据权利要求65或权利要求66所述的方法,其中(i)大于为或为约80%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约80%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,(ii)大于为或为约90%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约90%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,或者(iii)大于为或为约95%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约95%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

68. 根据权利要求66或权利要求67所述的方法,其中:

在对穿孔素呈阳性的所述细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍;并且/或者

在对颗粒酶B呈阳性的所述细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。

69. 根据权利要求1至68中任一项所述的方法,其中任选地通过CD107a表达测量,所述g-NK细胞组合物中大于10%的所述细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地其中所述脱颗粒是在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的不存在下测量的。

70. 根据权利要求1至69中任一项所述的方法,其中任选地通过CD107a表达测量,在所述g-NK细胞组合物中的所述细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗

体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的所述细胞表现出脱颗粒。

71. 根据权利要求1至70中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物中大于10%的所述细胞还能够产生针对肿瘤靶细胞的干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的不存在下测量的。

72. 根据权利要求1至71中任一项所述的方法,其中在所述g-NK细胞组合物中的所述细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的所述细胞产生效应细胞因子。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

74. 根据权利要求72或权利要求73所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

75. 根据权利要求1至74中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物已经通过用经辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3⁻/CD57⁺细胞的离体扩增产生,其中所述CD3⁻/CD57⁺细胞来自自体受试者的生物样本富集。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述自体受试者是CMV血清阳性的。

77. 根据权利要求75或权利要求76所述的方法,其中所述自体受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样本来自为所述CD16 158V/V NK细胞基因型或所述CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。

78. 根据权利要求75至77中任一项所述的方法,其中来自所述自体受试者的外周血样本中至少为或为约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性),并且所述外周血样本中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平(NKG2A阴性)。

79. 根据权利要求75至77中任一项所述的方法,其中所述经辐照的饲养细胞在HLA I类和HLA II类方面存在缺陷。

80. 根据权利要求75至79中任一项所述的方法,其中所述经辐照的饲养细胞是221.AEH细胞。

81. 根据权利要求75至80中任一项所述的方法,其中在两种或更多种重组细胞因子的存在下进行所述培养,其中至少一种重组细胞因子是白细胞介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。

83. 根据权利要求81所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

84. 根据权利要求1至83中任一项所述的方法,其中所述组合物中的所述g-NK细胞来自单个自体受试者,所述g-NK细胞已经从相同生物样本被扩增。

85. 根据权利要求1至84中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中配制,任选地其中所述冷冻保护剂是DMSO并且所述冷冻保存培养基是5%至10%DMSO(v/v)。

86. 根据权利要求1至85中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞没有用抗原受体工程化,任选地其中所述抗原受体是嵌合抗原受体。

87. 根据权利要求1至86中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞没有用可分泌的细胞

因子、任选地细胞因子受体融合蛋白诸如IL-15受体融合蛋白(IL-15RF)工程化

88. 根据权利要求1至87中任一项所述的方法,其中所述方法不包括向所述受试者施用外源性细胞因子以支持NK细胞存活或扩增,其中所述外源性细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。

89. 根据权利要求1至88中任一项所述的方法,每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约为或为约 1×10^8 个细胞至为或为约 50×10^9 个细胞。

90. 根据权利要求1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 5×10^8 个细胞。

91. 根据权利要求1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 5×10^9 个细胞。

92. 根据权利要求1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 10×10^9 个细胞。

93. 根据权利要求1至92中任一项所述的方法,其中在所述施用所述剂量的g-NK细胞之前,所述受试者已经接受了淋巴细胞清除疗法。

94. 根据权利要求93所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和/或环磷酰胺。

95. 根据权利要求93或权利要求94所述的方法,其中所述淋巴细胞清除包括以为或为约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$,每天所述施用氟达拉滨,持续2至4天,和/或以为或为约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$,每天所述施用环磷酰胺,持续2至4天。

96. 根据权利要求94或权利要求95所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。

97. 根据权利要求1至96中任一项所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括每天以为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积所述施用氟达拉滨,以及每天以为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积施用环磷酰胺,各自持续2至4天,任选地持续3天。

98. 根据权利要求1至97中任一项所述的方法,其中在所述淋巴细胞清除疗法开始后两周内或者为或为约两周时开始施用一定剂量的g-NK细胞。

99. 根据权利要求1至97中任一项所述的方法,其中在所述淋巴细胞清除疗法开始后7天内或者为或为约7天时开始施用一定剂量的g-NK细胞。

100. 根据权利要求1至99中任一项所述的方法,其中所述个体是人。

101. 根据权利要求1至100中任一项所述的方法,其中所述组合中的所述NK细胞对于所述个体是同种异体的。

102. 根据权利要求1至101中任一项所述的方法,所述方法还包括施用外源性细胞因子支持以促进g-NK细胞在所述受试者体内的扩增或持久性,任选地其中所述外源性细胞因子是或包括IL-15。

自然杀伤细胞组合物的治疗和给药方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年4月21日提交的名称为“METHODS OF TREATMENT AND DOSING OF NATURAL KILLER CELL COMPOSITIONS”的美国临时申请号63/177,956的权益,其内容全文以引用方式并入以用于所有目的。

[0003] 通过引用并入序列列表

[0004] 本申请与电子格式的序列列表一起提交。序列列表作为2022年4月20日创建的名称为776032001240_SEQLIST.Txt的文件提供,该文件的大小为7,852字节。电子格式的序列列表中的信息通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开提供了涉及给药含有NK细胞的组合物的治疗方法和用途。所提供的方法和用途是用于治疗癌症(诸如多发性骨髓瘤或淋巴瘤)的方法和用途,包括与治疗该癌症的抗体组合。

背景技术

[0006] 人们已经频繁将基于抗体的疗法用于治疗癌症和其他疾病。对抗体疗法的响应通常集中于这些抗体对肿瘤细胞的直接抑制作用(例如,抑制生长因子受体以及随后诱导细胞凋亡),但是这些抗体的体内作用可能更复杂,并且可能涉及宿主免疫系统。自然杀伤(NK)细胞是免疫效应细胞,当Fc受体(CD16;Fc γ RIII)结合至与携带抗原的细胞结合的抗体的Fc部分时,该免疫效应细胞介导抗体依赖性细胞毒性。NK细胞,包括其特定的特化亚群,可用于治疗方法,包括用于改善对抗体疗法的响应。对于涉及NK细胞的治疗用途,包括与抗体的组合,需要改进的方法。本文提供了满足此类需要的实施方案。

发明内容

[0007] 本文提供了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用。本文提供了用于治疗患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者的方法中的FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用。

[0008] 在一些实施方案中,该方法可以是没有组合施用用于治疗多发性骨髓瘤的外源性抗体的单一疗法。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用针对多发性骨髓瘤抗原的抗体。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤抗原包含选自CD38、SLAMF7和BCMA的抗原。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗体是抗SLAMF7抗体。在一些实施方案中,抗体是抗BCMA抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD38抗体。在一些实施方案中,抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和BCMA。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和SLAMF7。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和CD38。在一

些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗CD38抗体。

[0009] 在一些实施方案中,抗体每四周施用一次。在一些实施方案中,抗体每三周施用一次。在一些实施方案中,抗体每两周施用一次。在一些实施方案中,抗体每周施用一次。在一些实施方案中,抗体每周施用两次。在一些实施方案中,抗体每周施用两次以上。

[0010] 本文还提供了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD38抗体的施用。本文还提供了用于治疗患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者的方法中的FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD38抗体的施用。

[0011] 在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可在14天周期中以两个剂量施用,其中14天周期可重复一至三次。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可作为六个总剂量施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0012] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体可每周一次剂量施用,任选地持续一个或两个28天周期。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)可以为或为约8mg/kg至约32mg/kg的量施用,任选地为或为约16mg/kg。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)可在包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物中施用,任选地其中抗CD38抗体组合物包括达雷妥尤单抗和重组人透明质酸酶PH20(例如,透明质酸酶-fihj)。

[0013] 在一些实施方案中,抗CD38抗体组合物可每周一次剂量施用,任选地持续一个或两个28天周期。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体组合物包括约1800mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和约30,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD38抗体、任选地抗CD38抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD38抗体。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤可以是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0014] 在一些实施方案中,g-NK细胞具有低CD38表达或没有该表达,任选地其中g-NK细胞组合物中少于25%的细胞对表面CD38呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中的细胞未被工程化以减少或消除CD38表达。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物表现出最小的抗CD38诱导的同种相杀,任选地其中g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗CD38诱

导的同种相杀。

[0015] 本文提供了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用。本文提供了用于治疗患有淋巴瘤的受试者的方法中的FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用。在一些实施方案中,该方法可以是没有组合施用用于治疗淋巴瘤的外源性抗体的单一疗法。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用针对淋巴瘤抗原的抗体。在一些实施方案中,淋巴瘤抗原包含选自CD19、CD20和CD30的抗原。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD19抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD30抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16以及选自CD19、CD20和CD30的第二抗原。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和CD19。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和CD20。在一些实施方案中,双特异性抗体针对CD16和CD30。在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗CD20抗体。

[0016] 在一些实施方案中,抗体每四周施用一次。在一些实施方案中,抗体每三周施用一次。在一些实施方案中,抗体每两周施用一次。在一些实施方案中,抗体每周施用一次。在一些实施方案中,抗体每周施用两次。在一些实施方案中,抗体每周施用两次以上。

[0017] 本文还提供了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD20抗体的施用。本文还提供了用于治疗患有淋巴瘤的受试者的方法中的FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD20抗体的施用。

[0018] 在一些实施方案中,淋巴瘤可以是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可在14天周期中以两个剂量施用,其中14天周期可重复一至三次。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可作为六个总剂量施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是利妥昔单抗。

[0019] 在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个半月内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体可每周一次剂量施用,任选地4或8个剂量。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体可以为或为约250mg/m²至500mg/m²,任选地为或为约375mg/m²的量施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是皮下施用。

[0020] 在一些实施方案中,抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)可以包括透明质酸酶的抗CD20抗体组合物施用,任选地其中抗CD20抗体组合物包括利妥昔单抗和人重组透明质酸酶PH20。在一些实施方案中,抗CD20抗体组合物可作为每周一次剂量静脉内施用,任选地在每周一次剂量的抗CD20抗体后施用4或8个剂量或任选地3或7个剂量。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单

抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括约1400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约23,400U透明酯酸酶。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括约1600mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约26,800U透明酯酸酶。

[0021] 在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD20抗体、任选地抗CD20抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD20抗体。在一些实施方案中,在g-NK细胞组合物中的细胞中,大于为或为约60%的细胞是g-NK细胞,大于为或为约70%的细胞是g-NK细胞,大于为或为约80%的细胞是g-NK细胞,大于为或为约90%的细胞是g-NK细胞,或者大于为或为约95%的细胞是g-NK细胞。

[0022] 在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中至少为或为约50%的细胞为FcR γ 缺陷型(FcR γ 阴性)NK细胞(g-NK),其中大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,(i)大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,(ii)大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,或者(iii)大于为或为约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0023] 在一些实施方案中,在对穿孔素呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的穿孔素平均水平为FcR γ 阳性的细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍;和/或在颗粒酶B呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR γ 阳性的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。在一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,g-NK细胞组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地其中脱颗粒可在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量。

[0024] 在一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,在g-NK细胞组合物中的细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞表现出脱颗粒。

[0025] 在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中大于10%的细胞能够产生针对肿瘤靶细胞的干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中该干扰素- γ 或TNF- α 可在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量。在一些实施方案中,在g-NK细胞组合物中的细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞产生效应细胞因子。在一些实施方案中,效应细胞因子可以是IFN- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,效应细胞因子可以是IFN- γ 和TNF- α 。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物已经通过用经辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3-/CD57+细胞的离体扩增产生,其中CD3-/CD57+细胞来自自体受试者的生物样本富集。

[0026] 在一些实施方案中,自体受试者可以是CMV血清阳性的。在一些实施方案中,自体受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/FNK细胞基因型,任选地其中生物样

本可来自为CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。在一些实施方案中,来自该供体受试者的外周血样本中至少为或为约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性),并且外周血样本中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平(NKG2A阴性)。在一些实施方案中,经辐照的饲养细胞在HLA I类和HLA II类方面存在缺陷。在一些实施方案中,经辐照的饲养细胞是221.AEH细胞。

[0027] 在一些实施方案中,可在两种或更多种重组细胞因子的存在下进行培养,其中至少一种重组细胞因子可以是白细胞介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子可以是IL-21。在一些实施方案中,重组细胞因子是IL-21和IL-2。在一些实施方案中,重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。在一些实施方案中,组合物中的g-NK细胞来自单个供体受试者,其已经从相同生物样本被扩增。在一些实施方案中,其中g-NK细胞组合物可在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中配制,任选地其中冷冻保护剂可以是DMSO并且冷冻保存培养基可以是5%至10%DMSO(v/v)。

[0028] 在一些实施方案中,g-NK细胞没有用抗原受体工程化,任选地其中抗原受体可以是嵌合抗原受体。在一些实施方案中,g-NK细胞没有用可分泌的细胞因子、任选地细胞因子受体融合蛋白诸如IL-15受体融合蛋白(IL-15RF)工程化。在一些实施方案中,该方法不包括向受试者施用外源性细胞因子以支持NK细胞存活或扩增,其中外源性细胞因子可以是IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。

[0029] 在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞可以是g-NK细胞组合物的为或为约为或为约 1×10^8 个细胞至为或为约 50×10^9 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 10×10^9 个细胞。在一些实施方案中,在施用该剂量的g-NK细胞之前,受试者已经接受了淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和/或环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除包括以为或为约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$,每天施用氟达拉滨,持续2至4天,和/或以为或为约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$,每天施用环磷酰胺,持续2至4天。

[0030] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括每天以为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积施用氟达拉滨,以及每天以为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积施用环磷酰胺,各自持续2至4天,任选地持续3天。

[0031] 在一些实施方案中,在淋巴细胞清除疗法开始后两周内或者为或为约两周时可开始施用一定剂量的g-NK细胞。在一些实施方案中,在淋巴细胞清除疗法开始后7天内或者为或为约7天时开始施用一定剂量的g-NK细胞。在一些实施方案中,个体可以是人。在一些实施方案中,组合物中的NK细胞对于个体而言是异体的。在一些实施方案中,该方法还包括施用外源性细胞因子支持以促进g-NK细胞在受试者体内的扩增或持久性,任选地其中外源性细胞因子可以是或包括IL-15。

附图说明

[0032] 图1A和图1B描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的扩增。图1A示出了总NK细胞计数。图1B示出了扩增21天后的g-NK细胞计数。

[0033] 图2A和图2B描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞扩增后21天时的达雷妥尤单抗(daratumumab)和埃罗妥珠单抗(elotuzumab)介导的细胞毒活性。图2A示出了g-NK细胞对LP1细胞系的细胞毒性。图2B示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的细胞毒性。

[0034] 图3A至图3D描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{阳性})。图3A示出了扩增后13天时g-NK细胞对LP1细胞系的脱颗粒水平。图3B示出了扩增后13天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。图3C示出了扩增后21天时g-NK细胞对LP1细胞系的脱颗粒水平。图3D示出了扩增后21天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0035] 图4A至图4D描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图4A以g-NK细胞的百分比示出了扩增后13天时的穿孔素和颗粒酶B的表达。图4B示出了扩增后13天时的总穿孔素和颗粒酶B的表达。图4C以g-NK细胞的百分比示出了扩增后21天时的穿孔素和颗粒酶B的表达。图4D示出了扩增后21天时的总穿孔素和颗粒酶B的表达。

[0036] 图5A至图5D描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 的表达水平。图5A示出了扩增后13天时g-NK细胞对LP1细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图5B示出了扩增后13天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图5C示出了扩增后21天时g-NK细胞对LP1细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图5D示出了扩增后21天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的干扰素- γ 的表达水平。

[0037] 图6A至图6D描绘了在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图6A示出了扩增后13天时g-NK细胞对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图6B示出了扩增后13天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。图6C示出了扩增后21天时g-NK细胞对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图6D示出了扩增后21天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0038] 图7描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增15天的NK细胞的g-NK细胞扩增。

[0039] 图8A至图8J示出了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能。

[0040] 图8A和图8B描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的细胞毒活性。图8A示出了g-NK细胞对LP1细胞系的细胞毒性。图8B示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的细胞毒性。

[0041] 图8C和图8D描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达

雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平 (CD107a^{阳性})。图8C示出了g-NK细胞对LP1细胞系的脱颗粒水平。图8D示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0042] 图8E和图8F描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图8E以g-NK细胞的百分比示出了穿孔素和颗粒酶B的表达。图8F示出了总穿孔素和颗粒酶B的表达。

[0043] 图8G和图8H描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 的表达水平。图8G示出了g-NK细胞对LP1细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图8H示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的干扰素- γ 的表达水平。

[0044] 图8I和图8J描绘了在各种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图8I示出了g-NK细胞对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图8J示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0045] 图9A至图9L示出了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增14天的g-NK细胞的扩增和细胞效应子功能 (n=6)。

[0046] 图9A和图9B描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的扩增。图9A示出了扩增前后的g-NK细胞百分比。图9B示出了每1千万个NK细胞扩增的g-NK细胞的数量。数值为平均值 \pm SE。对于CD3^{阳性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增的比较, #p<0.001。对于CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增与其他CMV^{阳性}扩增的比较, ^p<0.05。对于CMV^{阳性}扩增与CMV^{阴性}CD3^{阳性}扩增的比较, *p<0.001。

[0047] 图9C描绘了扩增前后g-NK的比例(占来自CMV+供体 (n=8) 和CMV-供体 (n=6) 的总NK细胞的百分比) 的比较。图9D描绘了来自CMV+供体和CMV-供体的g-NK的n倍扩增速率的比较。图9E提供了CMV+供体的Fc ϵ R1 γ 对CD56的代表性流图。图9F提供了CMV+供体和CMV-供体的CD3-/CD56+NK细胞上的Fc ϵ R1 γ 表达的代表性直方图。使用独立样本t检验来确定扩增前后CMV+供体与CMV-供体之间的差异(图9C和图9D)。数值为平均值 \pm SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001。

[0048] 图9G和图9H描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞扩增后14天时的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的细胞毒活性。图9G示出了g-NK细胞对LP1细胞系的细胞毒性。图9H示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的细胞毒性。数值为平均值 \pm SE。对于CD3^{阳性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增的比较, *p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001。

[0049] 图9I和图9J描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平 (CD107a^{阳性})。图9I示出了扩增后14天时g-NK细胞对LP1细胞系的脱颗粒水平。图9J示出了扩增后14天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。数值为平均值 \pm SE。对于CD3^{阳性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增的比较, *p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001。

[0050] 图9K和图9L描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图9K以NK细胞的百分比示出了扩增后14天时的穿孔素和颗粒酶B的表达。图9L示出了扩增后14天时的总穿孔素和颗粒酶B的表达。数值为平均值 \pm SE。对于CD3^{阳性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增的比较, *p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001。

[0051] 图9M描绘了穿孔素(左)和颗粒酶B(右)在扩增的g-NK细胞和cNK细胞(n=5)中的基线表达。为了比较g-NK与cNK之间的效应穿孔素和颗粒酶B的表达,使用独立样本t检验。数值为平均值±SE。与cNK细胞的统计学显著差异用***p<0.001指示。

[0052] 图9N描绘了g-NK细胞和cNK细胞的穿孔素和颗粒酶B的表达的代表性直方图。

[0053] 图9O和图9P描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 的表达水平。图9O示出了扩增后14天时g-NK细胞对LP1细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图9P示出了扩增后14天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的干扰素- γ 的表达水平。数值为平均值±SE。对于CD3^{阴性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阴性}/CD57^{阳性}扩增的比较,*p<0.05,**p<0.01,并且***p<0.001。

[0054] 图9Q和图9R描绘了与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图9Q示出了扩增后14天时g-NK细胞对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图9R示出了扩增后14天时g-NK细胞对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。数值为平均值±SE。对于CD3^{阴性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{阴性}/CD57^{阳性}扩增的比较,*p<0.05,**p<0.01,并且***p<0.001。

[0055] 图9S描绘了在不同供体中,与cNK细胞相比,扩增的g-NK细胞对MM.1S细胞系的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 的表达水平。图9T描绘了在不同供体中,与cNK细胞相比,扩增的g-NK细胞对MM.1S细胞系的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。

[0056] 图10描绘了IL-21/抗IL-21复合物的存在下扩增的g-NK的扩增(n=4)。数值为平均值±SE。对于使用IL-21的扩增与使用IL-21/抗IL-21复合物的扩增的比较,#p<0.001。

[0057] 图11A至图11H示出了与新鲜富集的g-NK细胞的NK细胞效应子功能相比,先前冷冻保存的g-NK细胞的NK细胞效应子功能(n=4)。数值为平均值±SE。对于新鲜富集的g-NK细胞与先前冷冻保存的g-NK细胞的比较,#p<0.05。

[0058] 图11A和图11B描绘了与新鲜富集的g-NK细胞相比,先前冷冻保存的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{阳性})。图11A示出了g-NK细胞对LP1细胞系的脱颗粒水平。图11B示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0059] 图11C和图11D描绘了与新鲜富集的g-NK细胞相比,先前冷冻保存的g-NK细胞中穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图37C示出了g-NK细胞的总穿孔素表达。图11D示出了g-NK细胞的总颗粒酶B表达。

[0060] 图11E和图11F描绘了与新鲜富集的g-NK细胞相比,先前冷冻保存的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 的表达水平。图11E示出了g-NK细胞对LP1细胞系的干扰素- γ 的表达水平。图11F示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的干扰素- γ 的表达水平。

[0061] 图11G和图11H描绘了与新鲜富集的g-NK细胞相比,先前冷冻保存的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图37G示出了g-NK细胞对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图11H示出了g-NK细胞对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0062] 图12A至图12C描绘了在输注单剂量的 1×10^7 个扩增的细胞后,cNK(冷冻保存的)和g-NK(冷冻保存的或新鲜的)细胞在NSG小鼠中的持久性。图12A示出了在输注后第6、16、

26和31天收集的外周血中cNK细胞和g-NK细胞的数量。图12B示出了在输注后第31天,即处死时,存在于脾中的NK细胞的数量。图12C示出了处死时存在于骨髓中的NK细胞的数量。对于所有3个柱状条, $N=3$ 。数值为平均值 \pm SE。对于冷冻保存的cNK细胞与新鲜或冷冻保存的g-NK细胞的比较, $*p<0.05$,并且 $***p<0.001$ 。

[0063] 图13A至图13D描绘了CD20(利妥昔单抗(rituximab)的靶标)、CD38(达雷妥尤单抗的靶标)和SLAMF7(埃罗妥珠单抗的靶标)在g-NK和cNK上的表达。图13A示出了表达CD20的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和MM.1S细胞的百分比。图13B示出了表达CD38的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和MM.1S细胞的百分比。图13C示出了表达SLAMF7的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和MM.1S细胞的百分比。图13D示出了扩增前后表达CD38的cNK和g-NK的百分比。对于所有柱状条, $N=3$ 。

[0064] 图13E描绘了扩增前后 $CD38^{\text{阳性}}$ NK细胞的平均荧光强度(MFI)($n=4$)。

[0065] 图13F提供了代表性直方图,其描绘了相对于cNK细胞和MM.1S细胞,g-NK细胞的CD38表达降低。数值为平均值 \pm SE。对于g-NK细胞与所有其他细胞的比较, $\#p<0.001$ 。

[0066] 图13G描绘了扩增的g-NK细胞和cNK细胞造成的达雷妥尤单抗诱导的同种相杀(fratricide)的比较。

[0067] 图14A至图14F示出了在多发性骨髓瘤小鼠模型中用cNK和达雷妥尤单抗(cNK+达雷妥尤单抗)或g-NK和达雷妥尤单抗(g-NK+达雷妥尤单抗)进行的处理对肿瘤负荷和存活率的影响。将 5×10^5 个萤光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞静脉内(I.V.)注射到雌性NSG小鼠的尾静脉中。在五周的持续时间内,每周对NSG小鼠I.V.施用扩增的NK细胞(6.0×10^6 个细胞/小鼠)并且I.P.注射达雷妥尤单抗($10\mu\text{g}$ /小鼠)。图14A示出了在肿瘤接种后第20、27、37、41、48和57天每周两次的小鼠BLI成像(左)。处理后的对应天数示出在图的右侧。颜色指示BLI的强度(蓝色,最低;红色,最高)。图14B示出了相对于对照组和cNK+达雷妥尤单抗组,g-NK+达雷妥尤单抗组中肿瘤BLI(光子/秒)随时间的变化。对于g-NK组与对照组或cNK组的比较, $*p<0.05$ 。图14C示出了存活百分比随时间的变化,并且箭头指示用cNK+达雷妥尤单抗或g-NK+达雷妥尤单抗施用疗法。图14D呈现了对照组、cNK+达雷妥尤单抗组和g-NK+达雷妥尤单抗组中小鼠体重随时间的变化。图14E描绘了用cNK+达雷妥尤单抗以及用g-NK+达雷妥尤单抗处理的小鼠在处死时存在于骨髓中的 $CD138^+$ 肿瘤细胞的数量。对于g-NK细胞与cNK细胞的比较, $***p<0.001$ 。数值为平均值 \pm SE。图14F示出了使用门控策略来分辨对照组中和用cNK+达雷妥尤单抗或g-NK+达雷妥尤单抗处理的小鼠中NK细胞和肿瘤细胞的存在代表性流图。对于对照组, $N=8$,并且对于g-NK组或cNK组, $N=7$ 。

[0068] 图14G呈现了针对所有对照、cNK+达雷妥尤单抗和g-NK+达雷妥尤单抗处理的小鼠在整个研究中收集的所有BLI图像。颜色指示BLI的强度(蓝色,最低;红色,最高)。

[0069] 图14H描绘了在处死之前针对对照组、cNK+达雷妥尤单抗组和g-NK+达雷妥尤单抗组中的所有小鼠获得的X射线图像。箭头指示骨折和骨畸形。在每只小鼠下面指示了处死日期。

[0070] 图15A至图15C呈现了用cNK+达雷妥尤单抗或g-NK+达雷妥尤单抗处理后NSG小鼠中持久存在的NK细胞的比较数据。所有数据呈现了在处死时使用流式细胞术检测的细胞的数量。图15A示出了血液中cNK细胞和g-NK细胞的数量。图15B示出了存在于脾中的NK细胞的数量。图15C示出了存在于骨髓中的NK细胞的数量。数值为平均值 \pm SE。对于g-NK细胞与cNK细

胞的比较,*** $p < 0.001$ 。

[0071] 图16A至图16C示出了在淋巴瘤小鼠模型中用cNK和利妥昔单抗或g-NK和利妥昔单抗进行的处理对Raji细胞的存在和存活的影响。将 5×10^5 个荧光素酶标记的Raji淋巴瘤细胞静脉内(I.V.)注射到雌性NSG小鼠的尾静脉中。在七周的持续时间内,每周对NSG小鼠I.V.施用扩增的NK细胞(15×10^6 个细胞/小鼠)并且I.P.注射利妥昔单抗($200 \mu\text{g}$ /小鼠)。图16A示出了在肿瘤接种后第0、7、14、21、28和35天每周一次的BLI成像。图16B示出了随时间推移的存活百分比。图16C示出了随时间推移的体重变化(%)。

具体实施方式

[0072] 本文提供了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有癌症的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物。在一些实施方案中,所提供的方法涉及含有g-NK细胞的组合物用于治疗多发性骨髓瘤(MM)的方法和用途。在一些实施方案中,所提供的方法涉及含有g-NK细胞的组合物用于治疗淋巴瘤的方法和用途。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定数量的剂量施用。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物可与用于治疗癌症的抗体治疗剂组合施用,诸如与用于治疗多发性骨髓瘤的抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)、抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)或抗BCMA抗体(例如,贝兰他单抗(belantamab)),或与用于治疗淋巴瘤的抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)、抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗(tafasitamab)或朗妥昔单抗(loncastuximab)或抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗(brentuximab))。

[0073] 自然杀伤(NK)细胞是先天淋巴细胞,其对于通过细胞因子和趋化因子分泌以及通过释放细胞毒性颗粒来介导抗病毒和抗癌免疫而言非常重要(Vivier等人,Science,第331卷,第6013期:第44-49页,2011年;Caligiuri,Blood,第112卷第3期:第461-469页,2008年;Roda等人,Cancer Res.,第66卷第1期:第517-526页,2006年)。NK细胞是效应细胞,其包括第三大群淋巴细胞,并且对于针对肿瘤和病原体感染细胞的宿主免疫监视而言非常重要。然而,与T淋巴细胞和B淋巴细胞不同,NK细胞使用种系编码的激活受体,并且被认为仅具有有限的靶标识别能力(Bottino等人,Curr Top Microbiol Immunol.,第298卷:第175-182页,2006年;Stewart等人,Curr Top Microbiol Immunol.,第298卷:第1-21页,2006年)。

[0074] NK细胞的激活可通过以下途径发生:NK细胞受体直接结合至靶细胞上的配体,如直接杀死肿瘤细胞所见,或通过结合至与携带抗原的细胞结合的抗体的Fc部分而发生Fc受体(CD16;也称为CD16a或Fc γ RIIIa)的交联。激活后,NK细胞大量产生细胞因子和趋化因子,同时表现出有效的溶细胞活性。NK细胞能够经由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)而杀死肿瘤细胞。在一些情况下,当NK细胞表面上的受体(诸如CD16)识别出与细胞表面结合的IgG1或IgG3抗体时,ADCC被触发。这会触发释放含有穿孔素和颗粒酶的细胞质颗粒,从而导致靶细胞死亡。因为NK细胞表达激活Fc受体CD16(其识别IgG包被的靶细胞),所以靶标识别被扩大(Ravetch和Bolland,Annu Rev Immunol.,第19卷:第275-290页,2001年;Lanier,Nat.Immunol.,第9卷第5期:第495-502页,2008年;Bryceson和Long,Curr Opin Immunol.,第20卷第3期:第344-352页,2008年)。ADCC和抗体依赖性细胞因子/趋化因子的产生主要由NK细胞介导。

[0075] CD16还以糖基磷脂酰肌醇锚定形式(也称为Fc γ RIIIB或CD16B)存在。应当理解,

本文中提及的CD16是指在NK细胞上表达并且参与抗体依赖性响应(诸如NK细胞介导的ADCC)的CD16a形式,而不是指糖基磷脂酰肌醇锚定形式。

[0076] CD16受体能够与衔接子,即TCR-CD3复合物的 ζ 链(CD3 ζ)和/或FcR γ 链缔合,以通过基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)转导信号。在一些方面,CD16接合(CD16交联)经由胞内信号启动NK细胞响应,这些胞内信号通过CD16缔合衔接链FcR γ 或CD3 ζ 中的一者或两者生成。CD16的触发导致 γ 链或 ζ 链的磷酸化,这又募集酪氨酸激酶,即syk和ZAP-70,启动信号转导级联,从而导致快速和有效的效应子功能。最熟知的效应子功能是释放携带毒性蛋白的细胞质颗粒,以通过抗体依赖性细胞毒性的过程杀死附近的靶细胞。CD16交联还导致细胞因子和趋化因子的产生,这些细胞因子和趋化因子又激活并协调一系列免疫响应。

[0077] 细胞因子和趋化因子的这种释放可在体内NK细胞的抗癌活性中发挥作用。NK细胞在其细胞质中还具有含有穿孔素和蛋白酶(颗粒酶)的小颗粒。在从NK细胞释放后,穿孔素在靶细胞的细胞膜中形成孔,颗粒酶和相关分子可通过这些孔进入,诱导细胞凋亡。NK细胞诱导细胞凋亡而不是靶细胞坏死的事实非常重要—病毒感染细胞的坏死将会释放病毒粒子,而细胞凋亡导致细胞内病毒被破坏。

[0078] 缺少FcR γ 衔接蛋白的NK细胞的特化亚群(也称为g-NK细胞)能够介导有力的ADCC响应(参见例如已公开的专利申请号US2013/0295044)。响应增加的机制可能为由于表观遗传修饰的变化影响了FcR γ 表达。g-NK细胞大量表达信号传导衔接 ζ 链,但在信号传导衔接 γ 链的表达方面存在缺陷。与常规NK细胞相比,这些 γ 缺陷型g-NK细胞在被抗体激活时表现出显著增强的活性。例如,g-NK细胞可被抗体介导的CD16交联或被抗体包被的肿瘤细胞激活。在一些方面,与表达 γ 链的常规NK细胞相比,g-NK细胞产生更大量的细胞因子(例如IFN- γ 或TNF- α)和趋化因子(例如MIP-1 α 、MIP-1 β 和RANTES)和/或显示更高的脱颗粒响应。g-NK细胞提供颗粒酶B的高表达,颗粒酶B是自然杀伤细胞的细胞毒性机器的一种组分。此外,与常规NK细胞相比,g-NK细胞具有延长的寿命,并且它们的存在被长期维持。在一些实施方案中,g-NK细胞在功能和表型上是稳定的。

[0079] 在一些实施方案中,g-NK细胞在引发ADCC响应方面比常规NK细胞(例如无 γ 链缺陷的NK细胞)更有效。在一些实施方案中,g-NK细胞在引发细胞介导的细胞毒性方面比常规NK细胞更有效,甚至在不存在抗体的情况下也是如此。在一些情况下,ADCC是治疗性抗体(包括抗癌抗体)的作用机制。在一些方面,通过施用NK细胞的细胞疗法可与抗体一起用于治疗和相关目的。

[0080] 例如,某些治疗性单克隆抗体,诸如靶向CD38的达雷妥尤单抗、靶向SLAMF7的埃罗妥珠单抗和靶向BCMA的贝兰他单抗,被FDA批准用于治疗疾病,诸如多发性骨髓瘤(MM)。其他治疗性单克隆抗体,诸如靶向CD20的利妥昔单抗、靶向CD19的塔法西坦单抗或朗妥昔单抗和靶向CD30的维布妥昔单抗,被FDA批准用于治疗疾病,诸如淋巴瘤。虽然治疗性抗体的临床响应是有前途的,但它们通常并不理想。例如,虽然最初的临床响应通常是令人鼓舞的,特别是对于达雷妥尤单抗而言,但基本上所有的患者最终均会发展成进展性疾病。因此,非常需要新的策略来驱动更深的缓解或克服对这些药剂的抗性。所提供的实施方案(包括组合物)解决了这些需要。

[0081] 本文提供了涉及联合施用含有g-NK细胞(例如,通过所提供的方法产生的)和抗体

(例如,抗癌抗体)的组合物的方法。在一些实施方案中,由于g-NK细胞亚群的亲和性、细胞毒性和/或细胞因子介导的效应功能的改善,抗体导向的g-NK细胞靶向能为患者带来改善的结果。

[0082] 在一些实施方案中,单克隆抗体作为治疗剂的潜在作用机制是通过归因于补体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和/或抗体依赖性细胞细胞毒性的抗肿瘤作用。在一些情况下,预期由NK细胞介导的ADCC可有效地消除抗体结合的肿瘤细胞,特别是在多发性骨髓瘤(MM)肿瘤的情况下。

[0083] 当抗体的Fc部分结合其Fc受体(Fc γ RIIIa或CD16a)并通过涉及衔接蛋白CD3 ζ 和Fc ϵ R1 γ 的过程触发活化和脱颗粒时,NK细胞被活化。增强对抗体(包括MM抗体)的临床ADCC应答的努力一直具有挑战性,因为NK细胞也表达CD38和SLAMF7(例如分别是达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗的靶标)。高CD38表达尤其会导致在达雷妥尤单抗治疗过程早期时NK细胞的快速耗尽,从而在很大程度上消除了这种先天免疫细胞的来源,而这种来源有可能驱动更彻底的肿瘤根除。

[0084] 所提供的g-NK细胞和包含其的组合物,诸如通过所提供的方法产生的,表现出克服这些问题的许多特征。g-NK细胞是相对稀少的亚群,因为仅在25%至30%的CMV血清阳性的个体中仅在总NK细胞的约3%至10%的水平下可检测到g-NK细胞。所提供的方法涉及在扩增和富集g-NK细胞的能力方面特别稳健的方法,因此允许体内使用所需的充分扩增。

[0085] 在一些实施方案中,g-NK细胞比表达FcR γ 的自然杀伤细胞产生显著更大量的细胞因子。在另一个实施方案中,细胞因子是干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或它们的组合。在一个实施方案中,g-NK细胞产生显著更大量的趋化因子。在一个实施方案中,趋化因子是MIP-1 α 、MIP-1 β 或它们的组合。在另一个实施方案中,g-NK细胞在通过Fc受体CD16刺激后产生细胞因子或趋化因子。

[0086] g-NK细胞代表外周血中相对较小百分比的NK细胞,从而限制了在治疗方法中使用这些细胞的能力。特别地,为了在临床中利用g-NK细胞,高优先扩增速率是必需的,因为g-NK细胞通常是罕见的群体。用于扩增NK细胞的其他方法能够实现千倍的14天NK细胞扩增速率,但是它们产生低分化、NKG2C^{阳性}Fc ϵ RI γ ^{阳性}(FcR γ ^{阳性})NK细胞(Fujisaki等人,2009年,Cancer Res.,第69卷:第4010-4017页;Shah等人,2013年,PLoS One,8:e76781)。此外,本文发现,为扩增表型上与g-NK细胞重叠的NK细胞而优化的扩增不会优先将g-NK细胞扩增至支持治疗用途的量。特别地,先前已有报道指出,表现出与g-NK细胞表型重叠的NKG2C^{阳性}NK细胞可通过使用HLA-E转染的221.AEH细胞以及在培养基中包括IL-15来优先扩增(Bigley等人,2016年,Clin.Exp.Immunol.,第185卷:第239-251页)。用此类组成型表达HLA-E的HLA表达细胞进行培养能将NK细胞推向NKG2C^{阳性}/NKG2A^{阴性}表型的方向(NKG2C是HLA-E的激活受体,而NKG2A是HLA-E的抑制受体)。据信,因为此类细胞在其内部包括g-NK,所以此类方法将足以扩增g-NK细胞。然而,该方法不能实现g-NK细胞的有力扩增。

[0087] 本文所述的方法能够产生克服这些限制的富含g-NK细胞的NK细胞组合物。与先前的方法相比,所提供的方法利用了HLA I类和HLA II类方面存在缺陷的HLA-E+饲养细胞(例如221.AEH细胞)与NK细胞的更大比例。特别地,先前的方法使用较低比例的221.AEH细胞,诸如NK细胞与221.AEH的比例为10:1。本文发现,更大比例的表达HLA-E的饲养细胞(诸如221.AEH细胞)导致总体扩增更大并且更偏向g-NK表型。在一些实施方案中,通过辐照饲

养细胞,更大比例的HLA-E+饲养细胞(例如221.AEH细胞)是可能的。在一些方面,使用经辐照的饲养细胞系也是有利的,因为它提供了与GMP相容的方法。还发现在扩增期间包括重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或它们的组合中的任一者都支持有力扩增。在所提供的方法的具体实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,存在两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是IL-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21。

[0088] 本文提供的方法基于以下发现:在IL-21的存在下培养用于扩增的NK细胞能使NK细胞功能增强,以产生细胞因子或效应分子,诸如穿孔素和颗粒酶B。含有通过本文的扩增过程产生的NK细胞的组合物是高度功能性的,表现出有力的增殖,并且即使在它们被低温冷冻后不进行复苏时也能很好地工作。例如,当在IL-21的存在下扩增时,通过所提供的过程产生的NK细胞不仅表现出强ADCC活性,而且它们还表现出不依赖抗体的细胞毒活性。例如,效应分子(例如穿孔素和颗粒酶)自发地存在于通过所提供的方法扩增的NK细胞中,从而提供表现出高细胞毒性潜力的细胞。如本文所示,与通过仅包括IL-2而不添加IL-21的过程产生的NK细胞组合物相比,通过所提供的包括IL-21(例如IL-2、IL-15和IL-21)的过程产生的NK细胞组合物不仅表现出更高百分比的对穿孔素或颗粒酶B呈阳性的NK细胞,而且还表现出分子在细胞中的更高平均水平或程度的表达。此外,通过本文提供的包括IL-21(例如IL-2、IL-15和IL-12)的方法产生的NK细胞组合物还产生当与针对靶抗原(例如,CD38)的抗体(例如,达雷妥尤单抗)组合时响应于靶细胞而表现出显著的效应活性(包括脱颗粒和表达更多IFN- γ 和TNF- α 的能力)的g-NK细胞组合物。这种功能活性甚至在扩增的NK细胞的冷冻保存和解冻后仍高度保留。当经由CD16交联与抗体接合时,溶细胞酶的显著增加以及更有力的激活表型加强了扩增的g-NK细胞诱导肿瘤靶标发生细胞凋亡的能力。标记的抗体非依赖性效应子表型还支持g-NK细胞作为单一疗法的潜在效用。

[0089] 此外,本文的发现还证明了所提供的在IL-21的存在下扩增的NK细胞在延长的时间段内良好地持久存在和增殖的潜力,该潜力大于例如仅在IL-2的存在下而不添加IL-21时扩增的细胞的潜力。此外,结果显示冷冻保存的g-NK细胞以与新鲜g-NK细胞相当的水平持久存在。这种显著提高的持久性突出了新鲜或冷冻保存的g-NK作为现成的细胞疗法来增强抗体介导的ADCC的潜在效用。这种提高的持久性的发现是有利的,因为许多NK细胞疗法的临床效用受到有限的NK细胞持久性的阻碍。

[0090] 此外,本文的结果证明了令人惊奇的发现:g-NK细胞表达低水平的CD38,其是治疗性抗体诸如达雷妥尤单抗的靶标。许多现有的针对某些靶抗原(诸如CD38)的NK细胞疗法的问题是,NK细胞可能表达靶抗原,从而导致“同种相杀”,由此ADCC活性导致除肿瘤之外的NK细胞的消除。事实上,据报道其他报道的NK细胞组合物表达高百分比(例如,>90%)的CD38高NK细胞。相反,本文的发现表明,与常规NK细胞或MM靶细胞系相比,供体分离的g-NK细胞和由其扩增的g-NK细胞上的CD38阳性细胞的百分比显著更低。与常规NK细胞相比,较低的CD38表达导致g-NK细胞的由抗CD38(例如,达雷妥尤单抗)介导的同种相杀显著降低。这些结果支持了所提供的g-NK细胞组合物在MM中赋予增强的抗体抗肿瘤活性而不遭受与同种相杀相关的耗竭的效用。该结果进一步表明,g-NK细胞组合物对于达雷妥尤单抗难治性患者可能是最佳的,因为扩增的g-NK细胞对达雷妥尤单抗诱导的同种相杀具有抗性,并且增强了达雷妥尤单抗特异性细胞对甚至微弱表达CD38的骨髓瘤细胞的细胞毒性。

[0091] 此外,由g-NK细胞证明的上述活性可在不需要进一步工程化细胞以增强抗体功效的情况下实现。例如,已经产生了敲除CD38的NK细胞系以避免达雷妥尤单抗同种相杀,并且已经开发了具有不可切割CD16的NK细胞系以增强抗肿瘤ADCC。然而,临床应用的潜在缺点包括需要遗传工程化和无限增殖化细胞系的辐射。

[0092] 在评价g-NK细胞的体内活性的研究中进一步证明了所提供的g-NK细胞组合物(包括通过所提供的方法产生的那些)的优越性。在MM的示例性小鼠模型中的活性示出,g-NK细胞与抗体(例如,达雷妥尤单抗)的组合消除了大多数小鼠的骨髓瘤肿瘤负荷,具有持续和显著的肿瘤消退。这些结果强调了g-NK细胞的优越性,特别是与FcεR1 γ+的常规NK细胞相比,在增强体内抗体效果方面,并支持这种NK细胞疗法的治疗潜力。在该模型中,NK细胞的高持久性和增强的存活以及它们对同种相杀的抗性可支持g-NK细胞的优异的抗肿瘤效果和持久性。

[0093] 还发现,与仅最初基于CD3耗尽而富集NK细胞的方法相比,在扩增方法之前从细胞样本富集NK细胞,诸如通过在扩增之前富集CD16或CD57细胞,进一步显著增加了g-NK细胞扩增的量。在另一个实施方案中,可在扩增之前进行的另一种富集是通过CD56的正选择和CD38的负选择或耗尽来富集NK细胞。在另一个实施方案中,可在扩增之前进行的另一种富集是通过CD56的正选择、随后是NKG2A^{阳性}的负选择或耗尽以及CD161^{阳性}的负选择或耗尽来富集NK细胞。在另一个实施方案中,可在扩增之前进行的另一种富集是通过CD57的正选择、随后是NKG2A的负选择或耗尽和/或NKG2C的正选择来富集NK细胞。在另一个实施方案中,可在扩增之前进行的另一种富集是通过CD56的正选择、随后是NKG2A的负选择或耗尽和/或NKG2C的正选择来富集NK细胞。在此类实施方案中的任一个实施方案中,NKG2C^{阳性}和/或NKG2A^{阳性}NK细胞的富集可在扩增之后进行。

[0094] 在此类实施方案中的任一个实施方案中,富集的NK细胞可从含有NK细胞的细胞样本富集,诸如从外周血单核细胞(PBMC)富集。在一些实施方案中,在从细胞样本富集NK细胞之前,可通过CD3的负选择或耗尽来去除T细胞。在此类实施方案中的任一个实施方案中,富集的NK细胞可从含有NK细胞(其具有相对较高比例的g-NK细胞)的来自人受试者的生物样本(例如PBMC)富集,该生物样本例如来自由于在NK细胞中具有较高百分比的g-NK细胞而选择的人受试者。在此类实施方案中的任一个实施方案中,富集的NK细胞可从含有NK细胞的来自人受试者的生物样本(例如PBMC)富集,其中该样本含有相对较高比例的NKG2C^{阳性}NK细胞(例如为或为约或大于20%NKG2C^{阳性}NK细胞)和/或NKG2A^{阳性}NK细胞(例如为或为约或大于70%NKG2A^{阳性}NK细胞)。在此类实施方案中的任一个实施方案中,富集的NK细胞可从含有NK细胞的来自人受试者的生物样本(例如PBMC)富集,其中该样本含有相对较高比例的NKG2C^{阳性}NK细胞(例如为或为约或大于20%NKG2C^{阳性}NK细胞)和NKG2A^{阳性}NK细胞(例如为或为约或大于70%NKG2A^{阳性}NK细胞)。

[0095] 总之,从培养开始时的最初一千万个富集的NK细胞,所提供的扩增g-NK细胞的方法可实现扩增超过十亿个细胞,并且在一些情况下扩增高达八十亿或更多个NK细胞。特别地,所提供的方法可产生高产量(大于1000倍)的扩增速率,同时在扩增之后维持或在一些情况下增加g-NK细胞的功能性。在一些实施方案中,所提供的方法可产生表达高水平穿孔素和颗粒酶B的g-NK细胞群体。此外,发现所提供的方法足以扩增先前冷冻的NK细胞,这是许多涉及复苏解冻的NK细胞的现有方法通常不能实现的。在一些实施方案中,这通过增加

扩增计划的持续时间来实现。在一些实施方案中,这通过降低HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比例,例如降低至221.AEH与NK细胞的比例为约1:1来实现。在一些实施方案中,这通过在扩增期间包括重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或它们的组合中的任一者来实现。在具体实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,在两种或更多种重组细胞因子的存在下进行扩增,其中至少一种重组细胞因子是重组IL-21,并且至少一种重组细胞因子是重组IL-2。如本文所示,所提供的方法产生了表现出有效的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)以及非抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的g-NK细胞,从而支持此类细胞用于治疗应用的效用。

[0096] 如本文所示,所提供的g-NK细胞和含有该工程化g-NK细胞的组合物(诸如通过所提供的方法产生的)可用于癌症疗法。在一些方面,所提供的研究证明,当与抗肿瘤抗原的靶抗体(例如,抗骨髓瘤)组合时,g-NK细胞具有显著增强的ADCC/效应子功能,并且当与治疗性抗体(例如,达雷妥尤单抗)组合时,扩增的g-NK细胞的过继转移消除了肿瘤负荷。重要的是,异体NK细胞的过继转移不会导致严重的移植物抗宿主病(GVHD),并且因此此类细胞疗法(包括与抗体组合,以作为抗体导向的NK细胞疗法)可以“现成的”方式用于临床使用。

[0097] 本文所引用的所有参考文献,包括专利申请、专利公开以及科学文献和数据库,均通过引用整体并入本文以用于所有目的,其程度如同具体和单独地指明通过引用并入每个单独的参考文献一样。

[0098] 为了清楚阐明公开内容,而不是作为限制,将具体实施方式分成下面的小节。本文使用的章节标题均仅出于组织目的,而不应当被解释为限制所描述的主题。

[0099] I. 定义

[0100] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号以及其他技术和科学术语或专门用语均旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚阐明和/或为了便于参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文包括此类定义不一定被解释为代表与本领域通常理解的含义有实质差异。

[0101] 如本说明书和所附权利要求书所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非内容另有明确规定。因此,例如,对“一种分子”的提及任选地包括两种或更多种此类分子的组合。

[0102] 如本文所用,术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应的值的通常误差范围。本文提及“约”值或参数包含(并且描述)指向所述值或参数本身的实施例。

[0103] 应当理解,本文所述的本发明的各方面和实施方案包括“包括各方面和实施方案”、“由各方面和实施方案组成”和“基本上由各方面和实施方案组成”。

[0104] 如本文所用,“任选的”或“任选地”是指后续描述的事件或情形发生或不发生,并且该描述包括所述事件或情形发生的情况和所述事件或情形不发生的情况。例如,任选地取代的基团是指该基团未被取代或被取代。

[0105] 如本文所用,“抗体”是指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段,无论是天然的还是部分或完全合成的(诸如重组产生的),包括其含有免疫球蛋白分子的可变重链区和/或轻链区的至少一部分的任何片段,该部分足以形成抗原结合位点并且当组装时足以特异性结合抗原。因此,抗体包括具有与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体结合位点)同源或基本上同源

的结合结构域的任何蛋白。通常,抗体最低限度地包括可变重(V_H)链和/或可变轻(V_L)链的全部或至少一部分。通常, V_H 和 V_L 的配对一起形成抗原结合位点,但在一些情况下,单个 V_H 或 V_L 结构域足以进行抗原结合。抗体还可包括恒定区的全部或一部分。本文对抗体的提及包括全长抗体和抗原结合片段。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与“抗体”互换使用。

[0106] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,以指呈其基本上完整形式的抗体,如与抗体片段相对。全长抗体是通常具有两条全长重链(例如 $VH-CH1-CH2-CH3$ 或 $VH-CH1-CH2-CH3-CH4$)和两条全长轻链($VL-CL$)和铰链区的抗体,诸如通过分泌抗体的B细胞从哺乳动物物种(例如人、小鼠、大鼠、兔、非人灵长类等)产生的抗体和合成产生的具有相同结构域的抗体。具体地,全抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的抗体。恒定结构域可以为天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一个或多个效应子功能。

[0107] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,即完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利号5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.,第8卷第10期:第1057-1062页,1995年);单链抗体分子,包括单链Fv(scFv)或单链Fab(scFab);上述各项中的任一者的抗原结合片段和来自抗体片段的多特异性抗体。出于本文的目的,抗体片段通常包括足以与NK细胞表面上的CD16接合或交联的抗体片段。

[0108] 术语“自体的”是指来源于个体自身组织内或取自个体自身组织的细胞或组织。例如,在NK细胞的自体转移或移植中,供体和受体为同一个人。

[0109] 术语“异体的”是指属于或获自相同物种但在遗传上不同,并因此在一些情况下免疫不相容的细胞或组织。通常,术语“异体的”用于定义从供体移植到相同物种的受体的细胞。

[0110] 关于细胞组合物的术语“富集的”是指这样的组合物,其中与相同体积的起始组合物(诸如直接获自或分离自受试者的起始组合物)中的细胞类型的数量或百分比相比,细胞类型或群体的数量或百分比增加。该术语不要求从组合物中完全除去其他细胞、细胞类型或群体,也不要求这样富集的细胞以为或甚至接近为100%存在于富集的组合物中。

[0111] 术语“表达”是指多核苷酸从DNA模板转录(诸如转录成mRNA或其他RNA转录物)的过程和/或转录的mRNA随后翻译成肽、多肽或蛋白的过程。转录物和编码的多肽可统称为“基因产物”。如果多核苷酸来源于基因组DNA,则表达可包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0112] 关于蛋白或核酸的术语“异源的”是指源自不同遗传来源的蛋白或核酸。例如,与细胞异源的蛋白或核酸源自除表达它的细胞以外的生物体或个体。

[0113] 如本文所用,术语“引入”涵盖在体外或体内将DNA引入细胞中的多种方法,此类方法包括转化、转导、转染(例如电穿孔)和感染。载体可用于将编码分子的DNA引入细胞中。可能的载体包括质粒载体和病毒载体。病毒载体包括逆转录病毒载体、慢病毒载体或其他载体,诸如腺病毒载体或腺相关载体。

[0114] 术语“组合物”是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞或抗体)的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性溶液、非水性溶液或它们的任何组合。制剂通常为允许活性成分(例如抗体)的生物活性生效的形式。

[0115] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。

药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0116] 如本文所用,组合是指两个或更多个项目之间或之中的任何关联。该组合可以是两个或更多个单独的项目(诸如两种组合物或两种集合),可以是它们的混合物(诸如两个或更多个项目的单一混合物),或它们的任何变型。组合的元素通常在功能上相关联或相关。

[0117] 如本文所用,试剂盒是一种经包装的组合,其任选地包括其他元素,诸如附加药剂和使用该组合或其元素的说明书,以用于包括但不限于治疗用途的目的。

[0118] 如本文所用,术语“治疗”是指在临床病理学过程中设计用于改变被治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。期望的治疗效果包括减小疾病进展速度、改善或缓解疾病状态、以及缓解或改善预后。例如,如果与病症(例如,嗜酸性粒细胞介导的疾病)相关联的一种或多种症状减轻或消除,则个体被成功地“治疗”。例如,如果治疗使得提高患有疾病的人的生活质量、降低治疗疾病所需的其他药物的剂量、降低疾病复发的频率、减轻疾病的严重性、延迟疾病的发展或进展和/或延长个体的存活,则个体被成功地“治疗”。

[0119] “有效量”是指至少以必要剂量和时间段有效地实现期望的或指示的效果(包括治疗或预防结果)的量。有效量可在一次或多次施用中提供。“治疗有效量”至少是实现特定病症的可测量的改善所需的最小细胞剂量。在一些实施方案中,治疗有效量是降低与动物体内的癌症、病毒感染、微生物感染或败血性休克相关联的严重性、持续时间和/或症状的组合物的量。本文的治疗有效量可根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重等因素而变化。治疗有效量还可以是治疗有益作用超过抗体的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指以必要剂量和时间段有效地实现期望的预防结果的量。典型地但非必要地,由于预防剂量用于患病之前或患病早期阶段的受试者,所以预防有效量可小于治疗有效量。

[0120] 如本文所用,“个体”或“受试者”为哺乳动物。用于治疗目的的“哺乳动物”包括人、家畜和耕畜以及动物园动物、运动动物或宠物动物,诸如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、白鼬、大鼠、猫等。在一些实施方案中,个体或受试者为人。

[0121] II. 治疗方法

[0122] 本文提供了组合物和涉及所提供的细胞组合物的方法,这些细胞组合物包含本文所述的用于治疗受试者的疾病或病症的g-NK细胞。在一些实施方案中,本文提供了治疗个体的病症的方法,该方法包括向对其有需要的个体施用任何所提供的组合物,诸如包含g-NK细胞的组合物。在具体实施方案中,通过本文提供的方法产生该组合物。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如,涉及向患有疾病、病症或障碍的受试者施用治疗细胞或包含其的组合物。在一些情况下,疾病或障碍是肿瘤或癌症。在一些实施方案中,疾病或障碍是病毒感染。在一些实施方案中,细胞或其药物组合物以有效治疗疾病或障碍的量施用。用途包括细胞或其药物组合物在此类方法和治疗中的用途,以及在制备用于进行此类治疗方法的药物中的用途。在一些实施方案中,这些方法由此治疗受试者的疾病或病症或障碍。

[0123] 在一个方面,本文公开了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用。

[0124] 在一个方面,本文公开了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物

可每周一次以预先确定的剂量数施用。

[0125] 在一些实施方案中,每周一次剂量的预先确定数量是一次剂量、两次剂量、三次剂量、四次剂量、五次剂量、六次剂量、七次剂量、八次剂量、九次剂量、十次剂量、十一次剂量或十二次剂量。在一些实施方案中,每周一次剂量施用持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用六(6)次每周一次剂量的g-NK细胞组合物。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0126] 在一些实施方案中,在循环方案中施用每周一次剂量。在一些实施方案中,循环方案是14天周期。在一些实施方案中,在14天周期中施用两次每周一次剂量。在一些实施方案中,14天周期重复两次。在一些实施方案中,14天周期重复三次。

[0127] 在一些实施方案中,治疗方法或用途涉及向个体施用有效量的组合物,该组合物含有通过所提供的方法产生的扩增的NK细胞的组合物。在一些实施方案中,将此类扩增的NK细胞的为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} 、或为或为约 10^5 和为或为约 10^8 、或为或为约 10^6 和为或为约 10^{12} 、或为或为约 10^8 和为或为约 10^{11} 、或为或为约 10^9 和为或为约 10^{10} 个细胞施用给个体受试者。在一些实施方案中,将含有为或大于为或为约 10^5 、为或大于为或为约 10^6 、为或大于为或为约 10^7 、为或大于为或为约 10^8 、为或大于为或为约 10^9 、为或大于为或为约 10^{10} 、为或大于为或为约 10^{11} 、或者为或大于为或为约 10^{12} 个此类扩增的NK细胞的一定剂量的细胞施用给个体。在一些实施方案中,将每kg为或为约 10^6 至 10^{10} 个此类扩增的NK细胞施用给受试者。

[0128] 在一些实施方案中,治疗方法或用途涉及向个体施用有效量的任何所提供NK细胞组合物(包括如本文所述组合物)。在一些实施方案中,将来自任何所提供的组合物的为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} 、或为或为约 10^5 和为或为约 10^8 、或为或为约 10^6 和为或为约 10^{12} 、或为或为约 10^8 和为或为约 10^{11} 、或为或为约 10^9 和为或为约 10^{10} 个NK细胞施用给个体受试者。在一些实施方案中,将含有来自任何所提供的组合物的为或大于为或为约 10^5 、为或大于为或为约 10^6 、为或大于为或为约 10^7 、为或大于为或为约 10^8 、为或大于为或为约 10^9 、为或大于为或为约 10^{10} 、为或大于为或为约 10^{11} 、或者为或大于为或为约 10^{12} 个NK细胞的一定剂量的细胞施用给个体。在一些实施方案中,将每kg为或为约 10^6 至 10^{10} 个NK细胞的任何所提供的组合物施用给受试者。

[0129] 在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞可以是g-NK细胞组合物的为或为约为或为约 1×10^8 个细胞至为或为约 50×10^9 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,每个剂量的g-NK细胞是g-NK细胞组合物的可以为或可以为约 10×10^9 个细胞。

[0130] 在一些实施方案中,治疗方法包括向个体施用有效量的含有g-NK细胞的组合物。在一些实施方案中,该量为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^5 和为或为约 10^8 个g-NK细胞、或者为或为约 10^6 和为或为约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^8 和为或为约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^9 和为或为约 10^{10} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,将含有为或大于为或为约 10^5 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^6 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^7 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^8 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^9 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^{10} 个g-NK细胞、为或大于为或为约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或大于为或为

约 10^{12} 个g-NK细胞的一定剂量的细胞施用给个体。在一些实施方案中,将为或为约 10^6 至 10^{10} 个g-NK细胞/kg施用给受试者。

[0131] 在一些实施方案中,根据所提供治疗方法或用途中的任一者的施用剂量为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg,诸如为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 5×10^6 细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^6 个细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 5×10^5 个细胞/kg、为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 5×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 5×10^5 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^6 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或为约 1×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg、为或为约 1×10^6 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 1×10^6 个细胞/kg至为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 5×10^6 个细胞/kg、为或为约 5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg、为或为约 5×10^6 个细胞/kg至为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg、或者为或为 7.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用的剂量为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg,诸如为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 7.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 1×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 1×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、或者为或为约 7.5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg。

[0132] 在一些实施方案中,剂量以与g-NK细胞的替代标记物相关或包括该替代标记物的g-NK细胞或NK细胞亚群(诸如本文所述的任何NK细胞亚群)的数量(或任何前述的活细胞的数量)给出。在上述实施方案中的任一个实施方案中,剂量以通过所提供的方法产生的扩增的细胞的组合物中的细胞的数量或任何前述的活细胞的数量给出。

[0133] 在一些实施方案中,根据任何治疗方法或用途的施用剂量为或为约 5×10^7 至为或为约 10×10^9 ,诸如为或为约 5×10^7 至为或为约 5×10^9 、为或为约 5×10^7 至为或为约 1×10^9 、为或为约 5×10^7 至为或为约 5×10^8 、为或为约 5×10^7 至为或为约 1×10^8 、 1×10^8 至为或为约

10×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 5×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 1×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 5×10^8 、为或为约 5×10^8 至为或为约 10×10^9 、为或为约 5×10^8 至为或为约 5×10^9 、为或为约 5×10^8 至为或为约 1×10^9 、为或为约 1×10^9 至为或为约 10×10^9 、为或为约 1×10^9 至为或为约 5×10^9 、或者为或为约 5×10^9 至为或为约 10×10^9 。在一些实施方案中,施用剂量为或为约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,施用剂量为或为约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用剂量为或为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用剂量为或为约 1×10^{10} 个细胞。在一些实施方案中,剂量以与g-NK细胞的替代标记物相关或包括该替代标记物的g-NK细胞或NK细胞亚群(诸如本文所述的任何NK细胞亚群)的数量(或任何前述的活细胞的数量)给出。在上述实施方案中的任一个实施方案中,剂量以通过所提供的方法产生的扩增的细胞的组合物中的细胞的数量或任何前述的活细胞的数量给出。

[0134] 在一些实施方案中,根据所提供的方法,在扩增后不久将含有扩增的NK细胞的组合物施用给个体。在其他实施方案中,将扩增的NK细胞储存或通过施用前在培养物中生长而扩增,诸如通过上述方法。例如,在施用给个体之前,NK细胞可储存6、12、18或24个月以上。

[0135] 在一些实施方案中,所提供的含有NK细胞以及它们的亚群(诸如g-NK细胞)的组合物可通过任何方便的途径(包括肠胃外途径,诸如皮下、肌内、静脉内和/或硬膜外施用途径)施用给受试者。

[0136] 在具体实施方案中,所提供组合物通过静脉内输注施用。在一些实施方案中,以1mL至100mL的体积通过静脉内输注施用为或为约 10×10^6 个细胞至为或为约 10×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或为约 50×10^6 个细胞。在一些实施方案中,施用为或为约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或为约 10×10^9 个细胞。确定用于输注的细胞体积以施用细胞数量在本领域技术人员的水平范围内。在一个示例中,通过静脉内输注约20mL体积的组合物(诸如解冻的冷冻保存的组合物,以为或为约 2.5×10^7 个细胞/mL(例如,200mL中为或为约 5×10^9 个细胞)的浓度配制)来施用 0.5×10^9 个细胞。

[0137] 在任何前述实施方案中,所提供的g-NK细胞及其组合物可用作治疗疾病或障碍的单一疗法。

[0138] A. 组合物和药物制剂

[0139] 在一些实施方案中,用于所提供的方法的组合物含有g-NK细胞。特别地,所提供的组合物中有富集g-NK细胞的细胞组合物。在一些实施方案中,用于所提供的方法中的组合物含有g-NK细胞,这些g-NK细胞是诸如通过所提供的方法中的任一种方法产生的扩增的NK细胞。在一些实施方案中,组合物含有NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物含有NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物含有NKG2C^{阳性}/NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。

[0140] 在一些实施方案中,组合物包括约5% - 99%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群,或5%与99%之间(包括端值)的任何百分比的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,与分离这些细胞的受试者体内天然存在的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,组合物可相对于总NK细胞或总细胞包括增加或更大百分比的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,百分比增加至少为或至少为约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0141] 在一些实施方案中,组合物可包括至少为或为约20%、至少为或为约30%、至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约81%、至少为或为约82%、至少为或为约83%、至少为或为约84%、至少为或为约85%、至少为或为约86%、至少为或为约87%、至少为或为约88%、至少为或为约89%、至少为或为约90%、至少为或为约91%、至少为或为约92%、至少为或为约93%、至少为或为约94%、至少为或为约95%、至少为或为约96%、至少为或为约97%、至少为或为约98%、至少为或为约99%,或基本上100%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物包括超过50%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过60%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过70%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过80%的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,所提供的组合物包括这样的组合物,其中NKG2C^{阳性}细胞或其亚群构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少为或为约60%、至少为或为约70%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、至少为或为约95%或更多。

[0142] 在一些实施方案中,组合物包括约5%-99%的NKG2A^{阳性}细胞或其亚群,或5%与99%之间(包括端值)的任何百分比的NKG2A^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,与分离这些细胞的受试者体内天然存在的NKG2A^{阳性}细胞或其亚群相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,组合物可相对于总NK细胞或总细胞包括增加或更大百分比的NKG2A^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,百分比增加至少为或至少为约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0143] 在一些实施方案中,组合物可包括至少为或为约20%、至少为或为约30%、至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约81%、至少为或为约82%、至少为或为约83%、至少为或为约84%、至少为或为约85%、至少为或为约86%、至少为或为约87%、至少为或为约88%、至少为或为约89%、至少为或为约90%、至少为或为约91%、至少为或为约92%、至少为或为约93%、至少为或为约94%、至少为或为约95%、至少为或为约96%、至少为或为约97%、至少为或为约98%、至少为或为约99%,或基本上100%的NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物包括超过50%的NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过60%的NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过70%的NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过80%的NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,所提供的组合物包括这样的组合物,其中NKG2A^{阴性}细胞或其亚群构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少为或为约60%、至少为或为约70%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、至少为或为约95%或更多。

[0144] 在一些实施方案中,组合物包括约5%-99%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群,或5%与99%之间(包括端值)的任何百分比的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,与分离这些细胞的受试者体内天然存在的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,组合物可相对于总NK细胞或总细胞包括增加或更大百分比的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,百分比增加至少为或至少为约2倍、3

倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0145] 在一些实施方案中,组合物可包括至少为或为约20%、至少为或为约30%、至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约81%、至少为或为约82%、至少为或为约83%、至少为或为约84%、至少为或为约85%、至少为或为约86%、至少为或为约87%、至少为或为约88%、至少为或为约89%、至少为或为约90%、至少为或为约91%、至少为或为约92%、至少为或为约93%、至少为或为约94%、至少为或为约95%、至少为或为约96%、至少为或为约97%、至少为或为约98%、至少为或为约99%,或基本上100%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物包括超过50%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过60%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过70%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在另一个实施方案中,组合物包括超过80%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,所提供的组合物包括这样的组合物,其中NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或其亚群构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少为或为约60%、至少为或为约70%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、至少为或为约95%或更多。

[0146] 在一些实施方案中,组合物包括约5%-99%的g-NK细胞,或5%与99%之间(包括端值)的任何百分比的g-NK细胞。在一些实施方案中,与分离这些细胞的受试者体内天然存在的g-NK相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,组合物可相对于总NK细胞或总细胞包括增加或更大百分比的g-NK细胞。在一些实施方案中,百分比增加至少为或至少为约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0147] 在一些实施方案中,组合物可包括至少为或为约20%、至少为或为约30%、至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约81%、至少为或为约82%、至少为或为约83%、至少为或为约84%、至少为或为约85%、至少为或为约86%、至少为或为约87%、至少为或为约88%、至少为或为约89%、至少为或为约90%、至少为或为约91%、至少为或为约92%、至少为或为约93%、至少为或为约94%、至少为或为约95%、至少为或为约96%、至少为或为约97%、至少为或为约98%、至少为或为约99%,或基本上100%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括超过50%的g-NK细胞。在另一个实施方案中,组合物包括超过70%的g-NK细胞。在另一个实施方案中,组合物包括超过80%的g-NK细胞。在一些实施方案中,所提供的组合物包括这样的组合物,其中g-NK细胞构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少为或为约60%、至少为或为约70%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、至少为或为约95%或更多。

[0148] 在一些实施方案中,组合物包括自然杀伤(NK)细胞亚群的群体,其中组合物中至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约55%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%或至少为或为约95%的细胞具有CD57^{阳性}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,组合物中为或为约70%至为或为约90%的细胞具有表型CD57^{阳性}。在一些实施

方案中,组合物中至少为或为约72%、至少为或为约74%、至少为或为约76%、至少为或为约78%、至少为或为约80%、至少为或为约82%、至少为或为约84%、至少为或为约86%、至少为或为约88%、至少为或为约90%、至少为或为约92%、至少为或为约94%、至少为或为约96%、或者至少为或为约98%的细胞具有表型CD57^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约60%的细胞包括表型CD57^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约70%的细胞包括表型CD57^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于50%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约50%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于70%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约70%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0149] 在一些实施方案中,组合物包括自然杀伤(NK)细胞亚群的群体,其中组合物中至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约55%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%或至少为或为约95%的细胞具有CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,组合物中为或为约70%至为或为约90%的细胞具有表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少为或为约72%、至少为或为约74%、至少为或为约76%、至少为或为约78%、至少为或为约80%、至少为或为约82%、至少为或为约84%、至少为或为约86%、至少为或为约88%、至少为或为约90%、至少为或为约92%、至少为或为约94%、至少为或为约96%、或者至少为或为约98%的细胞具有表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约60%的细胞包括表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约70%的细胞包括表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于50%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约50%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于70%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约70%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0150] 在一些实施方案中,组合物包括自然杀伤(NK)细胞亚群的群体,其中组合物中至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约55%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、或者至少为或为约95%的细胞具有CD38^{阳性}的表型。在一些实施方案中,组合物中为或为约70%至为或为约90%的细胞具有表型CD38^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少为或为约72%、至少为或为约74%、至少为或为约76%、至少为或为约78%、至少为或为约80%、至少为或为约82%、至少为或为约84%、至少为或为约86%、至少为或为约88%、至少为或为约90%、至少为或为约92%、至少为或为约94%、至少为或为约96%、或者至少为或为约98%的细胞具有表型CD38^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约60%的细胞包括表型CD38^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一

些实施方案中,组合中至少为或为约70%的细胞包括表型CD38^{阴性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于50%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约50%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于70%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约70%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0151] 在一些实施方案中,组合物包括自然杀伤(NK)细胞亚群的群体,其中组合物中至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约55%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、或者至少为或为约95%的细胞具有CD16^{阳性}的表型。在一些实施方案中,组合物中为或为约70%至为或为约90%的细胞具有表型CD16^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少为或为约72%、至少为或为约74%、至少为或为约76%、至少为或为约78%、至少为或为约80%、至少为或为约82%、至少为或为约84%、至少为或为约86%、至少为或为约88%、至少为或为约90%、至少为或为约92%、至少为或为约94%、至少为或为约96%、或者至少为或为约98%的细胞具有表型CD16^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约60%的细胞包括表型CD16^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约70%的细胞包括表型CD16^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于50%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约50%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于70%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约70%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0152] 在一些实施方案中,组合物包括自然杀伤(NK)细胞亚群的群体,其中组合物中至少为或为约40%、至少为或为约50%、至少为或为约55%、至少为或为约60%、至少为或为约65%、至少为或为约70%、至少为或为约75%、至少为或为约80%、至少为或为约85%、至少为或为约90%、或者至少为或为约95%的细胞具有NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,组合物中为或为约70%至为或为约90%的细胞具有表型NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少为或为约72%、至少为或为约74%、至少为或为约76%、至少为或为约78%、至少为或为约80%、至少为或为约82%、至少为或为约84%、至少为或为约86%、至少为或为约88%、至少为或为约90%、至少为或为约92%、至少为或为约94%、至少为或为约96%、或者至少为或为约98%的细胞具有表型NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约60%的细胞包括表型NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少为或为约70%的细胞包括表型NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于50%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约50%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,在具有此类表型的细胞中,大于70%的细胞为FcR γ ^{阳性},任选地为或为约70%至90%的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0153] 在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约50%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约55%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约60%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约65%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约70%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约75%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约80%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约85%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约90%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括NK细胞群体,其中组合物中大于为或为约95%的NK细胞是g-NK细胞($\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$)或表达其替代标记物谱的NK细胞。替代标记物谱可为本文所述的任一种替代标记物谱。例如,替代标记物谱可为 $\text{CD16}^{\text{阳性}}/\text{CD57}^{\text{阳性}}/\text{CD7}^{\text{微弱/阳性}}/\text{CD161}^{\text{阳性}}$ 。在其他示例中,替代标记物谱可为 $\text{NKG2A}^{\text{阳性}}/\text{CD161}^{\text{阳性}}$ 。在其他示例中,g-NK细胞替代标记物谱为 $\text{CD38}^{\text{阳性}}$ 。替代表面标记物谱还可包括表型 $\text{CD45}^{\text{阳性}}/\text{CD3}^{\text{阳性}}/\text{CD56}^{\text{阳性}}$ 。

[0154] 在一些实施方案中,组合物的g-NK细胞或其某一百分比(例如大于为约70%)对穿孔素和/或颗粒酶B呈阳性。测定对穿孔素或颗粒酶B呈阳性的细胞数量的方法是本领域技术人员已知的。这些方法包括例如胞内流式细胞术。在示例中,对穿孔素或颗粒酶B呈阳性的细胞的百分比或数量可通过以下过程来确定:例如使用来自Miltenyi Biotec的胞内染色试剂盒(Inside Stain Kit)进行细胞的透化,然后用针对穿孔素和颗粒酶B的抗体进行染色。然后可例如使用流式细胞术来分辨细胞染色。

[0155] 在一些实施方案中,组合物的大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于为或为约75%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约75%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于为或为约85%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于为或为约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于为或为约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0156] 在一些实施方案中,NK细胞(例如g-NK细胞)的穿孔素和颗粒酶B的表达水平可通过胞内流式细胞术测量,并且表达水平是基于平均荧光强度(MFI)的水平测量的。在一些实施方案中,基于MFI的穿孔素和颗粒酶B的表达水平在g-NK细胞与 $\text{FcR } \gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞之间将不

同。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对穿孔素呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对穿孔素呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约三倍。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对穿孔素呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约四倍。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约三倍。在一些实施方案中,基于MFI水平,组合物的对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ NK细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约四倍。

[0157] 在一些实施方案中,组合物中至少为或为约50%的细胞为FcR γ 缺陷型NK细胞(g-NK),其中大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于为或为约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 。

[0158] 在任何实施方案中的一些实施方案中,在对穿孔素呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍。在任何实施方案中的一些实施方案中,在对颗粒酶B呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。

[0159] 在任何实施方案中的一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地其中脱颗粒是在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。在任何实施方案中的一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,在组合物中的细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞表现出脱颗粒。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于10%的细胞能够产生针对肿瘤靶细胞的干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中该干扰素- γ 或TNF- α 是在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

[0160] 在一些实施方案中,在组合物中的细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞产生效应细胞因子。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达SLAMF7的肿瘤细胞系,并且抗体是抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达BCMA的肿瘤细胞系,并且抗体是抗BCMA抗体(例如,贝兰他单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。例如,在一些实施

方案中,靶细胞可以是表达CD19的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗或朗妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD30的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)。

[0161] 在一些实施方案中,组合物中至少为或为约50%的细胞为FcR γ 缺陷型(FcR γ^{null}) NK细胞(g-NK),并且其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,组合物中大于为或为约15%的细胞产生效应细胞因子。在一些实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞产生效应细胞因子。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达SLAMF7的肿瘤细胞系,并且抗体是抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达BCMA的肿瘤细胞系,并且抗体是抗BCMA抗体(例如,贝兰他单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD19的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗或朗妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD30的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)。

[0162] 在任何实施方案中的一些实施方案中,效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。在任何实施方案中的一些实施方案中,效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

[0163] 在任何实施方案中的一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,在组合物中的细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞表现出脱颗粒。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达SLAMF7的肿瘤细胞系,并且抗体是抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达BCMA的肿瘤细胞系,并且抗体是抗BCMA抗体(例如,贝兰他单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD19的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗或朗妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD30的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)。

[0164] 在一些实施方案中,组合物中至少为或为约50%的细胞为FcR γ 缺陷型(FcR γ^{null}) NK细胞(g-NK),并且其中任选地通过CD107a表达测量,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,组合物中大于为或为约15%的细胞表现出脱颗粒。在一些实施方案中,任选地通过CD107a表达测量,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的细胞表现出脱颗粒。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达SLAMF7的肿瘤细胞系,并且抗体是抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达BCMA的肿瘤细胞系,并且抗体是抗BCMA抗体(例如,贝兰他单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD20的肿瘤细

胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD19的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗或朗妥昔单抗)。例如,在一些实施方案中,靶细胞可以是表达CD30的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)。

[0165] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于为或为约60%的细胞是g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于为或为约70%的细胞是g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于为或为约80%的细胞是g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于为或为约90%的细胞是g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于为或为约95%的细胞是g-NK细胞。

[0166] 在一些实施方案中,g-NK细胞表现出g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,g-NK细胞替代标记物谱是CD16阳性/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,g-NK细胞替代标记物谱是NKG2A^{阴性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,g-NK细胞替代标记物谱是CD38^{阴性}。在一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱还是CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。

[0167] 在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约60%的细胞是g-NK细胞。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约70%的细胞是g-NK细胞。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约80%的细胞是g-NK细胞。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约90%的细胞是g-NK细胞。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约95%的细胞是g-NK细胞。

[0168] 在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约80%的细胞对穿孔素呈阳性。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约90%的细胞对穿孔素呈阳性。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,在对穿孔素呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的穿孔素平均水平为FcR γ ^{阳性}的细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍。

[0169] 在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约80%的细胞对颗粒酶B呈阳性。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,大于为或为约90%的细胞对颗粒酶B呈阳性。在任何前述实施方案中的一些实施方案中,在对颗粒酶B呈阳性的细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR γ ^{阳性}的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。

[0170] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^6 个细胞至为或为约 10^{12} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^6 至为或为约 10^{11} 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^9 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^8 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^7 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^{12} 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^{11} 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^9 个细胞、或者为或为约 10^7 至为或为约 10^8 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^{12} 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^{11} 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^9 个细胞、为或为约 10^9 至为或为约 10^{12} 个细胞、为或为约 10^9 至为或为约 10^{11} 个细胞、为或为约 10^9 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^{10} 至为或为约 10^{12} 个细胞、为或为约 10^{10} 至为或为约 10^{11} 个细胞、或者为或为约 10^{11} 至为或为约 10^{12}

个细胞。

[0171] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或至少为约 10^6 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^6 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^9 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^8 个细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^7 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^9 个细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^8 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^{10} 个细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^9 个细胞、或者为或为约 10^9 至为或为约 10^{10} 个细胞。

[0172] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或至少为约 10^8 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或为约 10^9 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或为约 10^{10} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或为约 10^{11} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^8 至为或为约 10^{11} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^8 至为或为约 10^{10} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^8 至为或为约 10^9 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^9 至为或为约 10^{11} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^9 至为或为约 10^{10} 个细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^{10} 至为或为约 10^{11} 个细胞。

[0173] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包括至少为或为约 10^6 个g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物包含为或为约 10^6 至为或为约 10^{10} 个g-NK细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^9 个g-NK细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^8 个g-NK细胞、为或为约 10^6 至为或为约 10^7 个g-NK细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^{10} 个g-NK细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^9 个g-NK细胞、为或为约 10^7 至为或为约 10^8 个g-NK细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^{10} 个g-NK细胞、为或为约 10^8 至为或为约 10^9 个g-NK细胞、或者为或为约 10^9 至为或为约 10^{10} 个g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞是FcR γ ^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞是具有g-NK替代表面标记物谱的细胞。在一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱是CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱是NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞或具有g-NK替代标记物谱的细胞还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞或具有g-NK替代标记物谱的细胞还包括表面表型CD38^{阳性}。

[0174] 在任何所提供的组合物的具体实施方案中,组合物中的细胞来自同一供体。因此,组合物不包括来自一个或多个不同供体的细胞的混合群体。如本文所提供的,扩增方法导致某些NK细胞亚群,特别是g-NK细胞亚群或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群(诸如上述NK细胞亚群中的任一种细胞亚群)的高产率扩增,该高产率扩增为500倍或以上、600倍或以上、700倍或以上、800倍或以上、900倍或以上、1000倍或以上或更高。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约1000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2500倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约3000倍以

为约 7.5×10^6 个细胞/kg、或者为或为 7.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^7 个细胞/kg。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg,诸如为或为约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 7.5×10^5 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 1×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 1×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 2.5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、为或为约 5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg、或者为或为约 7.5×10^7 个细胞/kg至为或为约 1×10^8 个细胞/kg。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 5×10^7 至为或为约 10×10^9 ,诸如为或为约 5×10^7 至为或为约 5×10^9 、为或为约 5×10^7 至为或为约 1×10^9 、为或为约 5×10^7 至为或为约 5×10^8 、为或为约 5×10^7 至为或为约 1×10^8 、 1×10^8 至为或为约 10×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 5×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 1×10^9 、为或为约 1×10^8 至为或为约 5×10^8 、为或为约 5×10^8 至为或为约 10×10^9 、为或为约 5×10^8 至为或为约 5×10^9 、为或为约 5×10^8 至为或为约 1×10^9 、为或为约 1×10^9 至为或为约 10×10^9 、为或为约 1×10^9 至为或为约 5×10^9 、或者为或为约 5×10^9 至为或为约 10×10^9 。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,单独剂量为或为约 1×10^{10} 个细胞。在上述实施方案中的任一个实施方案中,剂量以与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的g-NK细胞或NK细胞亚群(诸如上述NK细胞亚群中的任一种细胞亚群)的数量(或任何前述的活细胞的数量)给出。在上述实施方案中的任一个实施方案中,剂量以通过方法产生的扩增的细胞的组合物中的细胞的数量或任何前述的活细胞的数量给出。

[0176] 在这些组合物中,有用于施用(诸如用于过继细胞疗法)的药物组合物和制剂。在一些实施方案中,将工程化细胞与药学上可接受的载体一起配制。

[0177] 药学上可接受的载体可包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等(Gennaro, 2000年, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams和Wilkins, Philadelphia, PA)。此类载体或稀释剂的示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介物,诸如固定油。也可将补充活性化合物掺入组合物中。药物载体应当为适用于NK细胞的载体,诸如盐水溶液、葡萄糖溶液或包括人血清白蛋白的溶液。

[0178] 在一些实施方案中,用于此类组合物的药学上可接受的载体或媒介物为任何无毒的水性溶液,在该溶液中NK细胞可维持或保持存活达足以允许施用活NK细胞的时间。例如,药学上可接受的载体或媒介物可为盐溶液或缓冲盐溶液。药学上可接受的载体或媒介物还可包括可增加NK细胞效率的各种生物材料。细胞媒介物和载体可例如包括多糖,诸如甲基纤维素(M.C. Tate, D.A. Shear, S.W. Hoffman, D.G. Stein, M.C. LaPlaca, Biomaterials, 第22卷:第1113页, 2001年, 其通过引用整体并入本文)、脱乙酰壳多糖(Suh J K F, Matthew H W T., Biomaterials, 第21卷:第2589页, 2000年; Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D S等人, J Biomed Mater Res, 第51卷:第586页, 2000年, 它们中的每一者通过引用整体并入本文)、N-异丙基丙烯酰胺共聚物P(NIPAM-co-AA) (Y.H. Bae, B. Vernon, C.K. Han, S.W. Kim,

J. Control. Release, 第53卷:第249页, 1998年; H. Gappa、M. Baudys、J. J. Koh、S. W. Kim、Y. H. Bae, Tissue Eng., 第7卷:第35页, 2001年, 它们中的每一者通过引用整体并入本文) 以及聚(氧乙烯)/聚(D, L-乳酸-共-乙醇酸) (B. Jeong、K. M. Lee、A. Gutowska、Y. H. An, Biomacromolecules, 第3卷:第865页, 2002年, 其通过引用整体并入本文)、P (PF-co-EG) (Suggs L J、Mikos A G., Cell Trans, 第8卷:第345页, 1999年, 其通过引用整体并入本文)、PEO/PEG (Mann B K、Gobin A S、Tsai A T、Schmedlen R H、West J L., Biomaterials, 第22卷:第3045页, 2001年; Bryant S J、Anseth K S., Biomaterials, 第22卷:第619页, 2001年, 它们中的每一者通过引用整体并入本文)、PVA (Chih-Ta Lee、Po-Han Kung和Yu-Der Lee, Carbohydrate Polymers, 第61卷:第348页, 2005年, 其通过引用整体并入本文)、胶原 (Lee C R、Grodzinsky A J、Spector M., Biomaterials, 第22卷:第3145页, 2001年, 其通过引用整体并入本文)、藻酸盐 (Bouhadir K H、Lee K Y、Alsberg E、Damm K L、Anderson K W、Mooney D J., Biotech Prog, 第17卷:第945页, 2001年; Smidsrd O、Skjak-Braek G., Trends Biotech, 第8卷:第71页, 1990年, 它们中的每一者通过引用整体并入本文)。

[0179] 在一些实施方案中, NK细胞 (诸如NKG2C^{阳性}细胞或其亚群) 可以有效量存在于组合物中。在一些实施方案中, 组合物含有有效量的g-NK细胞, 诸如FcR γ ^{阳性}细胞或具有其g-NK替代标记物谱的细胞。细胞的有效量可根据患者以及疾病的类型、严重性和程度而变化。因此, 医师可在考虑受试者的健康状况、疾病的程度和严重性以及其它变量后确定有效量是多少。

[0180] 在某些实施方案中, 组合物中此类细胞的数量是治疗有效量。在一些实施方案中, 该量是降低与动物体内的癌症、病毒感染、微生物感染或败血性休克相关联的严重性、持续时间和/或症状的量。在一些实施方案中, 治疗有效量是相对于未施用本文所述的组合物的患者 (或动物) 或一组患者 (或动物) 体内的癌症生长或扩散而言, 在施用该组合物的患者或动物体内导致癌症生长或扩散减少至少2.5%、至少5%、至少10%、至少15%、至少25%、至少35%、至少45%、至少50%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞剂量。在一些实施方案中, 治疗有效量是导致细胞毒活性的量, 该细胞毒活性导致抑制或减少癌症、病毒和微生物细胞生长的活性。

[0181] 在一些实施方案中, 组合物包含一定量的NKG2C^{阳性}细胞或其亚群, 该量为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、或者为或为约 10^5 至为或为约 10^8 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、或者为或为约 10^6 至为或为约 10^{12} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、或者为或为约 10^8 至为或为约 10^{11} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、或者为或为约 10^9 至为或为约 10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中, 组合物包括大于为或大于为约 10^5 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^6 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^7 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^8 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^9 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、为或为约 10^{11} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群、或者为或为约 10^{12} 个NKG2C^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中, 可将该量施用给患有疾病或病症的受试者, 诸如施用给癌症患者。

[0182] 在一些实施方案中, 组合物包含一定量的g-NK细胞, 该量为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^5 至为或为约 10^8 个g-NK细胞、或者为或为约 10^6 至为或为约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^8 至为或为约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^9 至为或为

约 10^{10} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于为或大于为约 10^5 个g-NK细胞、为或为约 10^6 个g-NK细胞、为或为约 10^7 个g-NK细胞、为或为约 10^8 个g-NK细胞、为或为约 10^9 个g-NK细胞、为或为约 10^{10} 个g-NK细胞、为或为约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或为约 10^{12} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,可将该量施用给患有疾病或病症的受试者,诸如施用给癌症患者。

[0183] 在一些实施方案中,组合物的体积为至少为或至少为约10mL、至少为或至少为约50mL、至少为或至少为约100mL、至少为或至少为约200mL、至少为或至少为约300mL、至少为或至少为约400mL、或者至少为或至少为约500mL,诸如为或为约10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL或200mL至500mL,各自包括端值在内。在一些实施方案中,组合物的细胞密度为至少为或至少为约 1×10^5 个细胞/mL、至少为或至少为约 5×10^5 个细胞/mL、至少为或至少为约 1×10^6 个细胞/mL、至少为或至少为约 5×10^6 个细胞/mL、至少为或至少为约 1×10^7 个细胞/mL、至少为或至少为约 5×10^7 个细胞/mL、或者至少为或至少为约 1×10^8 个细胞/mL。在一些实施方案中,组合物的细胞密度在或在约 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间、 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间、 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^6 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间或 1×10^7 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间,各自包括端值在内。

[0184] 在一些实施方案中,组合物(包括药物组合物)是无菌的。在一些实施方案中,细胞的分离、富集或培养在封闭或无菌环境中进行,例如在无菌培养袋中进行,以使误差、用户处置和/或污染最小化。在一些实施方案中,可例如通过无菌过滤膜过滤而容易地实现无菌。在一些实施方案中,使用透气性培养容器进行培养。在一些实施方案中,使用生物反应器进行培养。

[0185] 本文还提供了适于冷冻保存所提供的NK细胞的组合物。在一些实施方案中,在无血清冷冻保存培养基中冷冻保存NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂为或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约5%至为或为约10%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约5%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约6%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约7%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约8%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约9%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约10%DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基含有市售冷冻保存溶液(CryoStor™CS10)。CryoStor™CS10是含有10%二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基。在一些实施方案中,为冷冻保存配置的组合物可在低温(诸如超低温)下储存,例如在从 -40°C 至 -150°C 的温度范围内(诸如或约 $80^{\circ}\text{C} \pm 6.0^{\circ}\text{C}$)储存。

[0186] 在一些实施方案中,组合物可在施用给患者之前在超低温下保存。在一些方面,NK细胞亚群(诸如g-NK细胞)可被分离、处理和扩增(诸如根据所提供的方法),然后在施用给受试者之前在超低温下储存。

[0187] 例如,在美国专利号6,0168,991中描述了在超低温下进行小规模保存的典型方法。对于小规模,细胞可通过在预先冷却的5%人白蛋白血清(HAS)中低密度悬浮(例如,浓度为约 $200 \times 10^6/\text{ml}$)而在超低温下保存。可将等量的20%DMSO添加到HAS溶液中。可将混合

物的等分试样置于小瓶中,并在约-80℃的超低温室内冷冻过夜。

[0188] 在一些实施方案中,冷冻保存的NK细胞通过解冻来准备施用。在一些情况下,NK细胞可在解冻后立即施用给受试者。在此类实施方案中,组合物是即用型的,无需任何进一步处理。在其他情况下,NK细胞在解冻后被进一步处理(诸如通过用药学上可接受的载体重悬浮、用激活剂或刺激剂温育),或在施用给受试者之前被激活、洗涤并重悬浮于药学上可接受的缓冲液中。

[0189] B. 组合疗法

[0190] 在一些实施方案中,如本文提供的含有g-NK细胞的组合物可与一种或多种用于治疗受试者的疾病或病症的其他药剂在组合疗法中一起施用。在此类实施方案中,可在施用一种或多种其他药剂之前、同时或随后(之后)施用本文提供的含有g-NK细胞的组合物。例如,可将g-NK细胞与抗微生物剂、抗病毒剂和其他治疗剂同时或依次施用。示例性组合疗法描述于以下小节中。

[0191] 在一些实施方案中,含有本文提供的g-NK细胞的组合物在被抗体或含Fc的蛋白质激活或与之接触时表现出增强的活性,诸如与常规NK细胞相比。例如,g-NK细胞可被抗体介导的CD16交联或被抗体包被的肿瘤细胞激活。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供了治疗个体的病症的方法,该方法包括向受试者施用g-NK细胞或其组合物和抗体。本领域普通技术人员可选择合适的治疗性(例如,抗癌)单克隆抗体以与本文所述的所提供g-NK细胞和组合物一起施用给受试者,诸如取决于个体的特定疾病或病症。合适的抗体可包括多克隆、单克隆、片段(诸如Fab片段)、单链抗体和其他形式的特异性结合分子。

[0193] 在一些实施方案中,抗体还可包括人源化抗体或人抗体。非人抗体的人源化形式是嵌合Ig、Ig链或片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列),其包含源自非人Ig的最小序列。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域。

[0194] 通常,人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的对应序列来完成(Jones等人,1986年;Riechmann等人,1988年;Verhoeyen等人,1988年)。此类“人源化”抗体是嵌合抗体(1989年),其中显著少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些Fc残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。人源化抗体包括人抗体(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基置换。在一些情况下,对应的非人残基取代了人抗体的Fv框架残基。人源化抗体可包含既不存在于受体抗体中也不存在于输入的CDR或框架序列中的残基。一般来讲,人源化抗体基本上包括至少一个、通常是两个可变结构域的全部,其中大多数(如果不是全部的话)CDR区对应于非人Ig的CDR区,并且大多数(如果是全部的话)FR区是人抗体共有序列的FR区。人源化抗体最好还包含抗体恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人抗体的恒定区(Jones等人,1986年;Presta,1992年;Riechmann等人,1988年)。

[0195] 还可使用多种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,1991年;Marks等人,1991年)和人mAb的制备(Boerner等人,1991年;Reisfeld和Sell,1985年)。类似

地,将人Ig基因导入其中内源抗体基因已经部分或完全失活的转基因动物中可用于合成人Ab。在攻击后,观察到人抗体产生,其在所有方面上与人中所观察到的高度相似,包括基因重排、组装和抗体库(1997a;1997b;1997c;1997d;1997;1997;Fishwild等人,1996;1997;1997;2001;1996;1997;1997;1997;Lonberg和Huszar,1995;Lonberg等人,1994;Marks等人,1992;1997;1997;1997)。

[0196] 1. 多发性骨髓瘤

[0197] a. 抗CD38抗体

[0198] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(CD38)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗CD38抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,抗体是达雷妥尤单抗(例如,Darzalex™)。

[0199] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之后施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0200] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗CD38抗体。在一个方面,本文公开了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD38抗体的施用。

[0201] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD38抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始

[0202] 在具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0203] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗体施用一个或两个28天周期。在一些实施方案中,将抗体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0204] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是静脉内施用。

[0205] 在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)可以可为或为

约8mg/kg至约32mg/kg的量施用。在一些实施方案中,每个剂量为或为约16mg/kg。

[0206] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)可在包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物中施用。例如,抗体可作为包含达雷妥尤单抗和重组人透明酯酸酶PH20(例如,透明酯酸酶-fihj)的抗CD38抗体组合物施用。此类组合物的示例描述于公布的美国专利公布号US20170121414中。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD38抗体组合物包括约1800mg抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)和约30,000U透明酯酸酶(例如,透明酯酸酶-fihj)。

[0207] 在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD38抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD38抗体。

[0208] 在一些实施方案中,多发性骨髓瘤可以是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0209] 在一些实施方案中,g-NK细胞具有低CD38表达或没有该表达,诸如其中g-NK细胞组合物中少于25%的细胞对表面CD38呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中的细胞未被工程化以减少或消除CD38表达。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物表现出最小的抗CD38诱导的同种相杀,任选地其中g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗CD38诱导的同种相杀。

[0210] b. 抗SLAMF7抗体

[0211] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(SLAMF7)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗SLAMF7抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,抗体是埃罗妥珠单抗(例如,EMPLICITI[®])。

[0212] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0213] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗SLAMF7抗体。在一个方面,本文公开了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗SLAMF7抗体的施用。

[0214] 在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体可以是埃罗妥珠单抗。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗SLAMF7抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗SLAMF7抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗SLAMF7抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0215] 在具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相

关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0216] 在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗体施用一个或两个28天周期。在一些实施方案中,将抗体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0217] 在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体可以是皮下施用。

[0218] 在一些实施方案中,每个剂量的抗SLAMF7抗体(例如,埃罗妥珠单抗)可以可为或为约10mg/kg的量每周施用两个周期并且此后每2周施用一次。在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体与来那度胺和地塞米松一起施用。在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体在地塞米松、苯海拉明、雷尼替丁和对乙酰氨基酚之后施用。

[0219] 在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗SLAMF7抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗SLAMF7抗体。

[0220] 在一些实施方案中,多发性骨髓瘤可以是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0221] 在一些实施方案中,g-NK细胞具有低SLAMF7表达或没有该表达,诸如其中g-NK细胞组合物中少于25%的细胞对表面SLAMF7呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中的细胞未被工程化以减少或消除SLAMF7表达。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物表现出最小的抗SLAMF7诱导的同种相杀,任选地其中g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗SLAMF7诱导的同种相杀。

[0222] c. 抗BCMA抗体

[0223] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(BCMA)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗BCMA抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,抗体是贝兰他单抗(例如, Blenrep)。

[0224] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0225] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗BCMA抗体。在一个方面,本文公开了治疗多发性骨髓瘤的方法,其中该方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗BCMA抗体的施用。

[0226] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体可以是贝兰他单抗。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗BCMA抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月开始。在一些实施方

案中,该至少一个剂量的抗BCMA抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗BCMA抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0227] 在具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0228] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗BCMA抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗体施用一个或两个28天周期。在一些实施方案中,将抗体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0229] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗BCMA抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,抗BCMA抗体(例如,Blenrep)可以为或约2.5mg/kg作为静脉内输注在为或为约30分钟内施用。在一些实施方案中,每三周施用一次抗BCMA抗体(例如,Blenrep)。

[0230] 在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗BCMA抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗BCMA抗体。

[0231] 在一些实施方案中,多发性骨髓瘤可以是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0232] 在一些实施方案中,g-NK细胞具有低BCMA表达或没有该表达,诸如其中g-NK细胞组合物中少于25%的细胞对表面BCMA呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中的细胞未被工程化以减少或消除BCMA表达。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物表现出最小的抗BCMA诱导的同种相杀,任选地其中g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗BCMA诱导的同种相杀。

[0233] 2. 淋巴瘤

[0234] a. 抗CD20抗体

[0235] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(CD20)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗CD20抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗淋巴瘤,诸如非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,抗体是利妥昔单抗(例如,Rituxan[®])。

[0236] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之后施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0237] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用

了至少一个剂量的抗CD20抗体。在一个方面,本文公开了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD20抗体的施用。

[0238] 在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是利妥昔单抗。

[0239] 在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD20抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0240] 在具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0241] 在一些实施方案中,抗CD20抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗体施用一个或两个28天周期。在一些实施方案中,将抗体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0242] 在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是静脉内施用。

[0243] 在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体可以为或为约250mg/m²至约500mg/m²的量施用。在一些实施方案中,每个剂量以为或为约375mg/m²施用。

[0244] 在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)可以包括透明质酸酶的抗CD20抗体组合物施用。例如,抗体可作为包含利妥昔单抗和重组人透明酯酸酶PH20的抗CD20抗体组合物施用。此类组合物的示例性示例描述于公布的PCT公布号W02011029892中。

[0245] 在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括约1400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约23,400U透明酯酸酶。在一些实施方案中,每个剂量的抗CD20抗体组合物包括约1600mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约26,800U透明酯酸酶。

[0246] 在一些实施方案中,抗CD20抗体组合物可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体以4或8个剂量施用。在一些实施方案中,在静脉内施用每周一次剂量的抗CD20抗体后,皮下施用抗体3或7个剂量。在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD20抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD20抗体。

[0247] b. 抗CD19抗体

[0248] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(CD19)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗CD19抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗淋巴瘤,诸如非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,抗体是塔法西坦单抗(例如,MONJUVI[®])。在其他实施方案中,抗体是朗妥昔单抗(例如,ZYNLONTA[®])。

[0249] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之后施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0250] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗CD19抗体。在一个方面,此处公开了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了抗CD19抗体的施用。

[0251] 在一些实施方案中,CD19抗体可以是塔法西坦单抗。在其他实施方案中,CD19抗体可以是朗妥昔单抗。

[0252] 在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD19抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD19抗体可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD19抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0253] 在一个具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0254] 在一些实施方案中,抗CD19抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD19抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0255] 在一些实施方案中,抗CD19抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗CD19抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,以为或约12mg/kg施用抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗)。在一些实施方案中,抗CD19抗体(例如,塔法西坦单抗)施用超过四个周期。在一些实施方案中,第一周期包括在28天周期的第1、4、8、15和22天施用。在一些实施方案中,第二和第三周期包括在28天周期的第1、8、15和22天施用。在一些实施方案中,第四周期和更长周期包括在28天周期的第1天和第15天施用。在一些实施方案中,将抗CD19抗体(例如,塔法西

坦单抗)施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个周期。

[0256] 在一些实施方案中,每3周施用为或为约0.15mg/kg抗CD19抗体(例如,朗妥昔单抗),持续2个周期。在一些实施方案中,每3周施用为或为约0.075mg/kg抗CD19抗体(例如,朗妥昔单抗)用于随后的周期。在一些实施方案中,在施用抗CD19抗体(例如,朗妥昔单抗)之前施用地塞米松。

[0257] 在一些实施方案中,抗CD19抗体组合物可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD19抗体以4或8个剂量施用。在一些实施方案中,在静脉内施用每周一次剂量的抗CD19抗体后,皮下施用抗体3或7个剂量。在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD19抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD19抗体。

[0258] 示例性示例描述于W02020249528A1和美国专利号8,524,867中。

[0259] c. 抗CD30抗体

[0260] 在一些实施方案中,本发明的细胞可通过施用识别肿瘤相关抗原(CD30)的抗体而靶向肿瘤。在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用抗CD30抗体。在一些实施方案中,这些方法用于治疗淋巴瘤,诸如非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,抗体是维布妥昔单抗

[0261] (ADCETRIS[®])。

[0262] g-NK细胞和附加药剂可依次或同时施用。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之前施用附加药剂。在一些实施方案中,可在施用g-NK细胞之后施用附加药剂。例如,g-NK细胞可与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。另选地,g-NK细胞可在与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同的所选时间施用。

[0263] 在一些实施方案中,在施用一个剂量的g-NK细胞组合物之前,已经向受试者施用了至少一个剂量的抗CD30抗体。在一个方面,此处公开了治疗淋巴瘤的方法,其中该方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中g-NK细胞组合物可每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中该受试者在之前已经接受了抗CD30抗体的施用。

[0264] 在一些实施方案中,CD30抗体可以是维布妥昔单抗。

[0265] 在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD30抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的一个月内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD30抗体可在施用g-NK细胞组合物之前的三周内开始。在一些实施方案中,该至少一个剂量的抗CD30抗体的施用可在施用g-NK细胞组合物之前的两周内开始

[0266] 在一个具体示例中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生考虑具体抗体、具体疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般病症、受试者正在接受或之前已经接受的任何附加治疗以及其他相关因素来选择。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞群体。抗体以及g-NK细胞群体两者通常均经肠胃外(例如静脉内)施用;然而,也可使用至肿瘤或接近肿瘤(局部施用)的注射或输注或者至腹腔的施用。本领域技术人员可确定合适的施用途径。

[0267] 在一些实施方案中,抗CD30抗体可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD30抗体以循环方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天周期施用。在一些实施方案中,将抗

体在至少一个周期(诸如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,每周施用一次抗体持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长。在一些实施方案中,施用八(8)次每周一次剂量的抗体。在一些实施方案中,在连续数周内施用每周一次剂量。

[0268] 在一些实施方案中,抗CD30抗体可以是静脉内施用。在一些实施方案中,抗CD30抗体可以是皮下施用。在一些实施方案中,可以为或约1.8mg/kg施用抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)。在一些实施方案中,抗CD30抗体(例如,维布妥昔单抗)可以最多180mg施用。在一些实施方案中,抗CD30(例如,维布妥昔单抗)可每三周施用一次。

[0269] 在一些实施方案中,抗CD30抗体组合物可每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗CD30抗体以4或8个剂量施用。在一些实施方案中,在静脉内施用每周一次剂量的抗CD30抗体后,皮下施用抗体3或7个剂量。在一些实施方案中,该方法包括每周一次施用抗CD30抗体,共8个剂量,并且每周一次施用g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用一个剂量或两个剂量的抗CD30抗体。

[0270] 示例性示例描述于美国专利号7,659,241中。

[0271] 3. 双特异性抗体 (BsAb)

[0272] 在本文提供的一些实施方案中,g-NK细胞可与双特异性抗体(BsAb)组合施用给个体。BsAb被设计为识别两种不同的抗原或表位并与其结合。BsAb的示例是双特异性T细胞衔接子(BiTE)和双特异性自然杀伤细胞衔接子(BiKE)。已经产生了BiKE以接合自然杀伤细胞上的CD16以及第二肿瘤抗原,并且在文献中已经描述了靶向CD16和第二肿瘤抗原的BiKE的各种示例(Felices等人,2018年,Methods Mol.Bio.,第1441卷:第333-346页)。例如,BiKE已被开发用于B细胞非霍奇金淋巴瘤的CD16与CD19或CD20(Glorius等人,2013年,Leukemia,第27卷:第190-201页;Kipriyanov等人,2002年,J.Immunol,第169卷:第137-144页;Portner等人,2012年,Cancer immunology,immunotherapy:CII,第61卷:第1869-1875页);用于混合谱系白血病的CD16与CD19或CD33(Schubert等人,2011年,mAb,第3卷:第21-30页);用于B细胞非霍奇金淋巴瘤的CD16与CD19/CD22(Gleason等人,2012年,Mol.Cancer Ther.,第11卷:第2674-2684页);用于霍奇金淋巴瘤的CD16与CD30(Hombach等人,1993年,Int.J.Cancer,第55卷:第830-836页);以及用于多发性骨髓瘤的CD16与BCMA(Kakiuchi-Kiyota等人,2022年,Leukemia,第36卷:第1006-1014页)。

[0273] 在一些实施方案中,双特异性抗体是双特异性T细胞增强子。在一些实施方案中,双特异性抗体是双特异性NK细胞增强子。在一些实施方案中,双特异性NK细胞增强子(BiKE)的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶针对肿瘤抗原。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是CD19。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是CD20。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是CD30。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是CD38。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是SLAMF7。在一些实施方案中,BiKE的第一肿瘤靶是CD16,并且BiKE的第二肿瘤靶是BCMA。

[0274] 4. 细胞因子或生长因子

[0275] 在本文提供的一些实施方案中,g-NK细胞可与细胞因子和/或生长因子组合施用

给个体。根据一些实施方案,该至少一种生长因子包括选自SCF、FLT3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21和IL-27的生长因子。在具体实施方案中,将重组IL-2施用给受试者。在其他具体实施方案中,将重组IL-15施用给受试者。在其他具体实施方案中,将重组IL-21施用给受试者。在一些实施方案中,将g-NK细胞和细胞因子或生长因子依次施用。例如,可首先施用g-NK细胞,随后施用细胞因子和/或生长因子。在一些实施方案中,将g-NK细胞与细胞因子或生长因子同时施用。

[0276] 在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种细胞因子(诸如IL-2、IL-15、IL-21、IL-27和/或IL-12)以支持NK细胞的存活和/或生长。细胞因子可在NK细胞之前、之后或基本上同时施用。在一些示例中,细胞因子可在NK细胞之后施用。在一个具体示例中,在施用NK细胞的约1小时至8小时内(诸如在约1小时至4小时内、约2小时至6小时内、约4小时至6小时内或约5小时至8小时内)将细胞因子施用给受试者。

[0277] 5. 淋巴细胞清除疗法

[0278] 在一些实施方案中,所提供方法还可包括用另一种治疗,诸如用化学治疗剂或细胞毒性剂或其他治疗,施用g-NK细胞。

[0279] 在一些方面,所提供方法还可包括施用一种或多种淋巴细胞清除疗法,诸如在开始施用g-NK细胞组合物之前或同时施用。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括施用磷酰胺,诸如环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法可包括施用氟达拉滨。

[0280] 在一些方面,用免疫耗竭(例如,淋巴细胞清除)疗法预处理受试者可改善过继细胞疗法(ACT)的效果。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括环孢霉素和氟达拉滨的组合。

[0281] 这种预处理可以降低可能抑制疗法功效的各种结果中的一者或多者的风险为目标进行。这些现象包括称为“细胞因子汇集”的现象,通过该现象,T细胞、B细胞、NK细胞与TIL竞争稳态和活化细胞因子,诸如IL-2、IL-7和/或IL-15;调节T细胞、NK细胞或免疫系统的其他细胞抑制TIL;负调节剂在肿瘤微环境中的影响。Muranski等人,Nat Clin Pract Oncol.,12月;第3卷第12期:第668-681页,2006年。

[0282] 因此,在一些实施方案中,所提供方法还涉及向受试者施用淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,该方法包括在施用该剂量的细胞之前向受试者施用淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包含化疗剂,诸如氟达拉滨和/或环磷酰胺。在一些实施方案中,细胞和/或淋巴细胞清除疗法的施用经由门诊病人递送进行。

[0283] 在一些实施方案中,这些方法包括在施用该剂量的细胞之前向受试者施用预处理剂,诸如淋巴耗竭剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合。例如,可在第一次或随后的剂量之前至少2天,诸如之前至少3、4、5、6或7天向受试者施用预处理剂,诸如淋巴耗竭剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合。在一些实施方案中,在施用该剂量的细胞之前不超过7天,诸如之前不超过6、5、4、3或2天,向受试者施用预处理剂,诸如淋巴耗竭剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合。在一些实施方案中,在施用该剂量的细胞之前不超过14天,诸如之前不超过13、12、11、10、9或8天,向受试者施用预处理剂,诸如淋巴耗竭剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合。

[0284] 在一些实施方案中,用在或在约20mg/kg至100mg/kg之间,诸如在或在约40mg/kg至80mg/kg之间的剂量的环磷酰胺预处理受试者。在一些方面,用为或为约60mg/kg的环磷

酰胺预处理受试者。在一些实施方案中,氟达拉滨可以单剂量施用或可以多剂量施用,诸如每天、每隔一天或每三天施用。在一些实施方案中,环磷酰胺每天施用一次,持续一天或两天。

[0285] 在一些实施方案中,当淋巴耗竭剂包含氟达拉滨时,以在或在约 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 之间,诸如在或在约 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 之间、或在或在约 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $50\text{mg}/\text{m}^2$ 之间、或在或在约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 之间、或者在或在约 $24\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $26\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的剂量向受试者施用氟达拉滨。在一些情况下,向受试者施用 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 的氟达拉滨。在一些实施方案中,氟达拉滨可以单剂量施用或可以多剂量施用,诸如每天、每隔一天或每三天施用。在一些实施方案中,氟达拉滨每天施用,诸如持续1至5天,例如持续3至5天。

[0286] 在一些实施方案中,淋巴耗竭剂包含药剂的组合,诸如环磷酰胺和氟达拉滨的组合。因此,药剂的组合可包括任何剂量或给药方案的环磷酰胺,诸如上述那些,和任何剂量或给药方案的氟达拉滨,诸如上述那些。例如,在一些方面,在施用该剂量的细胞之前,向受试者施用 $60\text{mg}/\text{kg}$ (约 $2\text{g}/\text{m}^2$)的环磷酰胺和3至5个剂量的 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 氟达拉滨。

[0287] 在一些实施方案中,在施用该剂量的g-NK细胞之前,受试者已经接受了淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和/或环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除包括以为或为约 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$,每天施用氟达拉滨,持续2至4天,和/或以为或为约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积,任选地为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$,每天施用环磷酰胺,持续2至4天。

[0288] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括每天以为或为约 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积施用氟达拉滨,以及每天以为或为约 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 受试者体表面积施用环磷酰胺,各自持续2至4天,任选地持续3天。

[0289] 在一些实施方案中,在输注该剂量的细胞之前施用预处理剂改善了治疗的结果。例如,在一些方面,预处理,诸如淋巴耗竭剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合,改善了用该剂量治疗的功效或增加了NK细胞在受试者中的持久性。在一些实施方案中,预处理治疗增加了无病存活率,诸如在给予该剂量的细胞后的给定时间段后存活且没有表现出最小残留或分子可检测疾病的受试者的百分比。在一些实施方案中,增加了达到无疾病生存中值的时间。

[0290] 一旦将细胞施用给受试者(例如人),就在一些方面通过许多已知方法中的任一者测量工程化细胞群体的生物活性。评估参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,在体内,例如通过成像,或在体外,例如通过ELISA或流式细胞术。在某些实施方案中,NK细胞破坏靶细胞的能力可使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如在例如在以下内容中描述的细胞毒性测定:Kochenderfer等人,J. Immunotherapy,第32卷第7期:第689-702页,2009年;以及Herman等人,J. Immunological Methods,第285卷第1期:第25-40页,2004年。在某些实施方案中,还可通过分析某些细胞因子或其他效应分子(诸如CD107a、IFN γ 和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些方面,通过评估临床结果(诸如肿瘤负担或负荷的减少)来测量生物活性。在一些方面,评估毒性结果、细胞的持续和/或扩增、和/或宿主免疫应答的存在或不存在。

[0291] III. 用于扩增自然杀伤细胞亚群的方法

[0292] 在一些实施方案中,在所提供的方法中使用的g-NK细胞组合物来自人受试者的生物样本的NK细胞亚群离体扩增。在一些实施方案中,用于扩增和产生g-NK细胞组合物的方法可包括来自人受试者的生物样本扩增作为FcR γ 缺陷型NK细胞(g NK)的细胞亚群。在一些实施方案中,该方法可包括来自人受试者的生物样本扩增NKG2C^{阳性}的NK细胞亚群。在一些实施方案中,该方法可包括来自人受试者的生物样本扩增NKG2A^{阳性}的NK细胞的亚群。在一些实施方案中,该方法包括来自人受试者的生物样本分离富集自然杀伤(NK)细胞的细胞群体,并在g-NK细胞对象和/或与g-NK细胞亚群重叠或共享胞外表面标记物的NK细胞亚群优先生长和/或扩增的条件下培养这些细胞。例如,可使用饲养细胞或在细胞因子的存在下培养NK细胞,以增强g-NK细胞对象和/或与g-NK细胞亚群重叠或共享胞外表面标记物的NK细胞亚群的生长和/或扩增。在一些方面,所提供的方法还可扩增其他NK细胞亚群,诸如NKG2C^{阳性}和/或NKG2A^{阳性}的任何NK细胞。

[0293] 在一些实施方案中,样本(例如生物样本)是含有包括NK细胞群体的多种细胞群体的样本。在一些实施方案中,生物样本为或包括血细胞,例如外周血单核细胞。在一些方面,生物样本为全血样本、单采血液成分产物或白细胞单采血液成分产物。在一些实施方案中,样本为外周血单核细胞(PBMC)的样本。因此,在所提供的方法的一些实施方案中,可获得外周血单核细胞(PBMC)群体。根据所提供的方法,含有包括NK细胞群体的多种细胞群体的样本可用于富集或选择用于扩增的NK细胞亚群的细胞。

[0294] 在一些实施方案中,生物样本来自健康受试者。在一些实施方案中,生物样本来自患有疾病病症(例如癌症)的受试者。

[0295] 在一些实施方案中,细胞分离自或选自样本,诸如生物样本,例如获自或来源于受试者的样本,该受试者为诸如患有特定疾病或病症或需要细胞疗法或将向其施用细胞疗法的受试者。在一些方面,受试者为人,诸如作为需要特定治疗干预(诸如对细胞进行分离、处理和/或工程化的过继细胞疗法)的患者的受试者。因此,在一些实施方案中,细胞为原代细胞,例如原代人细胞。样本包括直接取自受试者的组织、体液和其他样本。生物样本可为直接从生物来源获得的样本或经处理的样本。生物样本包括但不限于体液,诸如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑液、尿液和汗液、组织和器官样本,包括来源于它们的经处理样本。在一些方面,样本为血液或血液来源样本,或者为或来源于单采血液成分或白细胞单采血液成分产物。

[0296] 在一些示例中,从受试者的循环血液获得细胞。在一些方面,样本含有淋巴细胞,包括NK细胞、T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板以外的细胞。在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以除去血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以用于随后的处理步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液不含钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在某些实施方案中,除去血细胞样本的组分并将细胞直接重悬浮于培养基中。在一些实施方案中,该方法包括基于密度的细胞分离方法,诸如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心(诸如通过使用Histopaque[®]密度离心)从外周血制备白细胞。

[0297] 在一些实施方案中,生物样本来自从正常外周血收集的富集的白细胞单采血液成分产物。在一些实施方案中,富集的白细胞单采血液成分产物可含有新鲜细胞。在一些实施

方案中,富集的白细胞单采血液成分产物是冷冻保存的样本,其被解冻以用于所提供的方法中。

[0298] 在一些实施方案中,生物细胞来源含有为或为约 5×10^5 至为或为约 5×10^8 个NK细胞或g-NK细胞亚群或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞或g-NK细胞亚群或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的数量为或为约 5×10^5 至为或为约 1×10^8 、为或为约 5×10^5 至为或为约 5×10^7 、为或为约 5×10^5 至为或为约 1×10^7 、为或为约 5×10^5 至为或为约 5×10^6 、为或为约 5×10^5 至为或为约 1×10^6 、为或为约 1×10^6 至为或为约 1×10^8 、为或为约 1×10^6 至为或为约 5×10^7 、为或为约 1×10^6 至为或为约 1×10^7 、为或为约 1×10^6 至为或为约 5×10^6 、为或为约 5×10^6 至为或为约 1×10^8 、为或为约 5×10^6 至为或为约 5×10^7 、为或为约 5×10^6 至为或为约 1×10^7 、为或为约 1×10^7 至为或为约 1×10^8 、为或为约 1×10^7 至为或为约 5×10^7 、或者为或为约 5×10^7 至为或为约 1×10^8 。

[0299] 在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约3%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约5%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约10%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约12%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约14%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约16%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约18%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约20%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约22%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约24%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约26%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约28%。在一些实施方案中,生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约30%。

[0300] 在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约3%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约5%,则选择该受试者。

在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约10%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约12%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约14%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约16%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约18%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约20%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约22%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约24%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约26%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约28%,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果生物样本中的NK细胞中,g-NK细胞或与g-NK细胞的替代标记物相关联或包括该替代标记物的NK细胞亚群的百分比大于为或为约30%,则选择该受试者。

[0301] 在一些实施方案中,生物样本来自CMV血清阳性的受试者。CMV感染可导致NK细胞的表型和功能分化,包括发展出高比例的表达NKG2C的NK细胞,其表现出增强的抗病毒活性。表达NKG2C的CMV相关NK细胞显示出DNA甲基化模式改变和信号传导分子(诸如FcR γ)表达降低(Schlums等人,Immunity,2015年,第42卷:第443-456页)。相对于常规NK细胞亚群,这些NK细胞与更有效的抗体依赖性激活、扩增和功能相关。在一些情况下,生物样本可来自CMV血清阴性的受试者,因为FcR γ 表达降低的NK细胞也可在CMV血清阴性个体体内检测到,尽管通常水平较低。在一些情况下,生物样本可来自CMV血清阳性个体。

[0302] 在一些实施方案中,基于外周血样本中对NKG2C呈阳性的NK细胞的百分比来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约25%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约35%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约45%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约55%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择

该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择该受试者。

[0303] 在一些实施方案中,基于外周血样本中对NKG2A呈阴性或低水平的NK细胞的百分比来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约75%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。

[0304] 在一些实施方案中,基于外周血样本中对NKG2C呈阳性的NK细胞的百分比和外周血样本中对NKG2A呈阴性或低水平的NK细胞的百分比两者来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约75%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。在一些实施方案中,如果外周血样本中至少为或为约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样本中至少为或为约95%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平,则选择该受试者。

[0305] 在一些实施方案中,如果受试者是CMV血清阳性的,并且如果在来自受试者的外周血样本中的NK细胞中,g-NK细胞的百分比大于为或为约30%,NKG2C^{阳性}细胞的百分比大于为或为约20%,并且NKG2A^{阳性}细胞的百分比大于为或为约70%,则根据所提供的方法选择该受试者进行细胞扩增。

[0306] 在一些实施方案中,来自受试者的NK细胞在CD16基因,核苷酸526[胸腺嘧啶(T)→鸟嘌呤(G)]中具有单核苷酸多态性(SNP rs396991),导致在成熟(经加工)形式的蛋白中的位置158处有缬氨酸(V)对苯丙氨酸(F)的氨基酸(aa)取代(F158V)。在一些实施方案中,NK细胞在两个等位基因中都具有CD16 158V多态性(本文中称为158V/V)。在一些实施方案中,NK细胞在单个等位基因中具有CD16 158V多态性(本文中称为158V/F)。应当理解,本文对158V+基因型的提及是指158V/V基因型和158V/F基因型两者。已经发现,CD16 F158V多态性与对IgG1抗体的显著更高的亲和性相关联,并且具有发动更有力的NK细胞介导的ADCC响应的能力(Mellor等人,2013年,Journal of Hematology&Oncology,第6卷:第1页;Musolino等人,2008年,Journal of Clinical Oncology,第26卷:第1789-1796页;以及Hatjiharissi等人,2007年,Blood,第110卷:第2561-2564页)。在一些实施方案中,由于CD16 158V+/g-NK细胞亚群的亲和性、细胞毒性和/或细胞因子介导的效应功能的改善,抗

体导向的CD16⁺158V⁺/g-NK细胞靶向能为患者带来改善的结果。

[0307] 在一些实施方案中,所提供的方法包括从被鉴定为具有CD16⁺158V⁺NK细胞基因型的受试者的生物样本富集或分离NK细胞或其亚群。在一些实施方案中,该方法包括筛选受试者是否存在CD16⁺158V⁺NK细胞基因型。在一些实施方案中,基因组DNA来自受试者的样本中提取,该样本为或包括NK细胞,诸如为血液样本或骨髓样本。在一些实施方案中,样本为或包括血细胞,例如外周血单核细胞。在一些实施方案中,样本为或包括分离的NK细胞。在一些实施方案中,样本为来自健康供体受试者的样本。可使用任何用于从样本中提取DNA的方法。例如,使用标准技术,诸如硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取,可容易地从样本(例如细胞)分离核酸(Chomocyznski等人,1987年,Anal. Biochem. 第162卷:第156页)。市售试剂盒也可方便地用于提取基因组DNA,诸如Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega, Madison, WI)。

[0308] 可对任何合适的样本进行基因分型。在本文所述的实施方案中的任一个实施方案中,基因分型反应可为例如焦磷酸测序反应、DNA测序反应、MassARRAY MALDI-TOF、RFLP、等位基因特异性PCR、实时等位基因鉴别或微阵列。在一些实施方案中,使用针对多态性的等位基因特异性引物进行基因组DNA的基于PCR的技术,诸如RT-PCR。用于扩增样本中的靶核酸序列的PCR方法是本领域熟知的,并且已经在例如以下文献中有所描述:Innis等人编辑,PCR Protocols (Academic Press, NY, 1990年); Taylor, 1991年Polymerase chain reaction: basic principles and automation, in PCR: A Practical Approach, McPherson等人编辑, IRL Press, Oxford; Saiki等人, 1986年, Nature, 第324卷:第163页;以及美国专利号4,683,195、4,683,202和4,889,818,这些文献均通过引用整体并入本文。

[0309] 用于检测158V⁺多态性的引物是已知的或可由技术人员容易地设计,参见例如,国际公开的PCT申请号W02012/061814; Kim等人, 2006年, Blood, 第108卷:第2720-2725页; Cartron等人, 2002年, Blood, 第99卷:第754-758页; Koene等人, 1997年, Blood, 第90卷:第1109-1114页; Hatijiharissi等人, 2007年, Blood, 第110卷:第2561-2564期; Somboonyosdech等人, 2012年, Asian Biomedicine, 第6卷:第883-889页)。在一些实施方案中,可使用嵌套引物进行PCR,随后进行等位基因特异性限制性酶消化。在一些实施方案中,第一PCR引物包含核酸序列5'-ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG-3' (SEQ ID NO:2)和5'-GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA-3' (SEQ ID NO:3),而第二PCR引物是5'-ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT-3' (SEQ ID NO:4)和5'-ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC-3' (SEQ ID NO:5),这在一些情况下根据等位基因的性质生成了94bp片段。在一些实施方案中,引物对包含SEQ ID NO:6 (CCCAACTCAA CTTCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:7 (GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAAT)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,引物对包含SEQ ID NO:6 (CCCAACTCAA CTTCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:8 (GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAA)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,引物对包含SEQ ID NO:6 (CCCAACTCAA CTTCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:9 (GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCA)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,可通过定量实时RT-PCR进行基因分型,随后使用如下的引物序列提取RNA: SEQ ID NO:10 (5'-CCAAAAGCCACACTCAAAGAC-3')中所示的CD16正义和SEQ ID NO:11 (5'-ACCCAGGTGGAAAGAATGATG-3')中所示的反义以及SEQ ID NO:12 (5'-AACATCACCATCACTCAAGGTTTGG-3')中所示的TaqMan探针。

[0310] 为了确认基因分型,等位基因特异性引物可与一组V等位基因特异性引物(例如

SEQ ID NO:13,5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAA-3'中所示的正向引物;和SEQ ID NO:14,5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3'中所示的反向引物)或一组F等位基因特异性引物(例如,SEQ ID NO:15,5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAC-3'中所示的正向引物;和SEQ ID NO:14,5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3'中所示的反向引物)一起使用。

[0311] CD16a的基因组序列可在NCBI数据库中以NG_009066.1获得。CD16A的基因ID是2214。CD16的序列信息,包括基因多态性,可从UniProt登录号P08637获得。CD16(F158)的序列在SEQ ID NO:16中所示(残基F158是粗体且加下划线的)。在一些实施方案中,CD16(F158)还包含如MWQLLLPTALLLVSA(SEQ ID NO:17)所示的信号肽。

[0312] GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIP KATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSS TRDWKDHKFKWRKDPQDK(SEQ ID NO:16)

[0313] CD16 158V+的序列(导致F158V的多态性)被称为VAR_003960并且具有SEQ ID NO:18中所示的序列(158V+多态性用粗体和下划线表示)。在一些实施方案中,CD16(158V+)还包含如MWQLLLPTALLLVSA(SEQ ID NO:17)所示的信号肽。

[0314] GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIP KATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSS TRDWKDHKFKWRKDPQDK(SEQ ID NO:18)

[0315] 在一些实施方案中,使用在5'端含有荧光染料标记(例如FAM或VIC)和在3'端含有小沟结合剂(MGB)和非荧光猝灭剂(NFQ)的等位基因特异性探针以及未标记的PCR引物,对基因组脱氧核糖核酸(DNA)样本进行单核苷酸多态性(SNP)分析,以检测特异性SNP靶标。在一些实施方案中,测定通过与探针缔合的染料的荧光变化来测量或检测SNP的存在。在此类实施方案中,探针与两个未标记的引物之间的靶DNA杂交,并且来自5'端的荧光染料的信号被其3'端的NFQ通过荧光共振能量转移(FRET)猝灭。在PCR期间,Taq聚合酶使用模板作为引导物延伸未标记的引物,并且当聚合酶到达标记的探针时,其切割将染料与猝灭剂分离的分子。在一些方面,qPCR仪器可检测来自未猝灭标记的荧光。示例性试剂是可商购获得的SNP测定,例如rs396991的代码C_25815666_10(Applied Biosystems,目录号4351379,用于CD16中F158V的SNP基因分型)。

[0316] 在一些实施方案中,鉴定了CD16 158V(F158V)多态性杂合或纯合的受试者。在一些实施方案中,鉴定了CD16 158V(F158V)多态性纯合的受试者。在一些实施方案中,从鉴定为CD16 158V多态性杂合或纯合的受试者的生物样本中分离或富集NK细胞或NK细胞亚群。在一些实施方案中,从鉴定为CD16 158V多态性纯合的受试者的生物样本中分离或富集NK细胞或NK细胞亚群。

[0317] 在一些实施方案中,方法包括从生物样本中富集NK细胞,诸如从受试者分离或获得的PBMC群体中。在一些实施方案中,通过基于一种或多种细胞特异性标记物的分离或选择来富集富集NK细胞的NK细胞群体。选择特定标记物或表面标记物的组合在本领域技术人员的水平范围内。在一些实施方案中,表面标记物是来自下列表面抗原中的任一者或多者:

CD11a、CD3、CD7、CD14、CD16、CD19、CD25、CD27、CD56、CD57、CD161、CD226、NKB1、CD62L；CD244、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2A、NKG2C、KIR2DL1和/或KIR2DL3。在一些实施方案中，表面标记物是来自下列表面抗原中的任一者或多者：CD11a、CD3、CD7、CD14、CD16、CD19、CD25、CD27、CD38、CD56、CD57、CD161、CD226、NKB1、CD62L；CD244、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2A、NKG2C、SLAMF7 (CD319)、KIR2DL1和/或KIR2DL3。在具体实施方案中，该一种或多种表面抗原包括CD3以及以下表面抗原CD16、CD56或CD57中的一者或多者。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3和CD57。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56或CD16。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56或CD38。在另外的实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56、NKG2A和CD161。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD57或NKG2C。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD57或NKG2A。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD57、NKG2C和NKG2A。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3和CD56。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56或NKG2C。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56或NKG2A。在一些实施方案中，该一种或多种表面抗原是CD3、CD56、NKG2C和NKG2A。用于检测此类表面抗原的试剂(包括荧光染料缀合的抗体)是熟知的并且对于技术人员是可获得的。

[0318] 在一些实施方案中，通过所提供方法从样本中富集(诸如通过分离或选择)NK细胞群体，该NK细胞群体是对一种或多种特定标记物(诸如表面标记物)的(标记物⁺或标记物^{阳性})呈阳性或表达高水平(标记物^高)的细胞，或对一种或多种标记物呈阴性或表达相对低水平(标记物^低或标记物^{阴性})的细胞。因此，应当理解，关于在细胞上或细胞中表达的标记物或蛋白质的术语阳性(positive、pos或+)在本文中可互换使用。同样，应当理解，关于在细胞上或细胞中表达的标记物或蛋白质的术语阴性(negative、neg或-)在本文中可互换使用。此外，应当理解，本文中对标记物^{阳性}的细胞的提及可指对标记物呈阴性的细胞以及表达相对低水平的标记物的细胞，诸如与对照或背景水平相比不易检测的低水平。在一些情况下，此类标记物是在某些NK细胞群体上不存在或以相对低水平表达但在某些其他淋巴细胞群体(诸如T细胞)上存在或以相对较高水平表达的那些标记物。在一些情况下，此类标记物是在某些NK细胞群体上存在或以相对较高水平表达但在某些其他淋巴细胞群体(诸如T细胞或其亚群)上不存在或以相对低水平表达的那些标记物。

[0319] 在一些实施方案中，可使用基于此类标记物的任何已知的分离方法。在一些实施方案中，分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如，在一些方面，分离包括基于一种或多种标记物(通常为细胞表面标记物)的表达或表达水平，例如，通过与特异性结合此类标记物的抗体或结合伴侣一起温育，随后通常进行洗涤步骤，并从未与抗体或结合伴侣结合的那些细胞中分离已结合抗体或结合伴侣的细胞，来分离细胞和细胞群体。在一些实施方案中，温育是静态的(没有混合)。在一些实施方案中，温育是动态的(混合)。

[0320] 此类分离步骤可基于阳性选择和/或阴性选择，在阳性选择中，保留已结合试剂的细胞用于进一步使用，在阴性选择中，保留没有与抗体或结合伴侣结合的细胞。在一些示例中，保留两种级分用于进一步使用。分离不需要导致特定细胞群体或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如，特定类型的细胞(诸如表达标记物的那些细胞)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比，但不必导致完全不存在不表达标记物的细胞。同样，特定类型的细胞(诸如表达标记物的那些细胞)的阴性选择、去除或耗尽是指降低此类

细胞的数量或百分比,但不必导致完全去除所有此类细胞。例如,在一些方面,CD3的阴性选择富集呈CD3^{阳性}的细胞群体,但也可含有一些残余或小百分比的其他未选择的细胞,在一些情况下,这些其他未选择的细胞可包括仍存在于富集体中的小百分比的呈CD3^{阳性}的细胞。在一些示例中,CD57^{阳性}或CD16^{阳性}群体中的一者的阳性选择富集所述群体,即CD57^{阳性}或CD16^{阳性}群体,但也可含有一些残余或小百分比的其他非选择的细胞,在一些情况下,这些其他未选择的细胞可包括仍存在于富集体中的CD57或CD16群体中的另一者。

[0321] 在一些示例中,进行多轮分离步骤,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,诸如随后的阳性或阴性选择。在一些示例中,单个分离步骤可同时耗尽表达多个标记物的细胞,诸如通过将细胞与多个抗体或结合伴侣一起温育,每个抗体或结合伴侣对靶向阴性选择的标记物具有特异性。同样,通过将细胞与在多种细胞类型上表达的多个抗体或结合伴侣一起温育,可同时阳性选择多种细胞类型。

[0322] 在一些方面,选择包括基于表面抗原中的一种或多种表面抗原的表达的阳性和/或阴性选择步骤,诸如在来自PBMC样本的细胞中。在一些实施方案中,分离包括表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择和/或表达CD38的细胞的阴性选择,和/或表达非NK细胞标记物(诸如T细胞标记物)的细胞的阴性选择,例如表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})。例如,在一些实施方案中,分离包括表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择,和/或表达非NK细胞标记物(诸如T细胞标记物)的细胞的阴性选择,例如表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})。在一些实施方案中,分离包括表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择,和/或表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{阳性})、表达CD161的细胞的阴性选择(CD161^{阳性})、表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阳性})、和/或表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})。在一些实施方案中,选择包括分离对CD3呈阴性的细胞(CD3^{阳性})。

[0323] 在一些实施方案中,分离包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})和表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性})。在一些实施方案中,选择还可包括表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}CD38^{阳性}。

[0324] 在一些实施方案中,选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})、对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性}),随后对表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阳性})和对表达CD161的细胞的阴性选择(CD161^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}NKG2A^{阳性}CD161^{阳性}。

[0325] 在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})和表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}。

[0326] 在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})和表达CD16的细胞的阳性选择(CD16^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD16^{阳性}。

[0327] 在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阳性})和表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}。例如,可通过耗尽CD3^{阳性}细胞(对CD3^{阳性}细胞的阴性选择),随后进行CD57^{阳性}细胞选择来富集NK细胞,从而分离并富集CD57^{阳性}NK细胞。可通过基于免疫亲和力的方法进行分离,诸如使用MACS™微珠。例如,在CD3^{阳性}细胞的阴性选择中,CD3微珠可用于耗尽CD3^{阳性}细胞。随后,CD57微珠可用于CD3细胞耗尽的PBMC的CD57富集。富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}的NK细胞然后可在所提供方法中用

于扩增。

[0328] 在一些实施方案中,选择还可包括表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{阳性})和/或细胞NKG2A的阴性选择(NKG2A^{阴性})。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{阳性})和表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}NKG2C^{阳性}。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{阳性})和表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}NKG2A^{阴性}。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{阳性})、表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{阳性})和表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}。

[0329] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,选择还可包括表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}CD38^{阴性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}CD38^{阴性}NKG2C^{阳性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}CD38^{阴性}NKG2A^{阴性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD57^{阳性}CD38^{阴性}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}。

[0330] 在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})和表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性})和表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{阳性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}NKG2C^{阳性}。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性})和表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}NKG2A^{阴性}。在一些实施方案中,选择包括表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})、表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{阳性})、表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{阳性})和表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}。

[0331] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,选择还可包括表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}CD38^{阴性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}CD38^{阴性}NKG2C^{阳性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}CD38^{阴性}NKG2A^{阴性}。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阳性}CD56^{阳性}CD38^{阴性}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}。

[0332] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞是具有g-NK替代表面标记物谱的细胞。在一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱是CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阴性}。在一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱是NKG2A^{阳性}/CD161^{阴性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱是CD38^{阳性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}用作NK细胞的替代表面标记物谱。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱进一步包括NK细胞替代表面标记物谱。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱还包括CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}。在具体实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45

阳性/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}。在其他具体实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在其他具体实施方案中,g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/CD38^{阳性}。

[0333] 在一些实施方案中,分离、选择和/或富集细胞的方法,诸如通过基于一个或多个细胞表面标记物的表达的阳性或阴性选择,可包括基于免疫亲和力的选择。在一些实施方案中,基于免疫亲和力的选择包括使含有细胞(诸如PBMC)的样本与特异性结合一个或多个细胞表面标记物的抗体或结合伴侣接触。在一些实施方案中,抗体或结合伴侣与固体载体或基质结合,诸如球体或珠,例如微珠、纳米珠(包括琼脂糖)、磁珠或顺磁性珠,以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择。在一些实施方案中,可将球或珠填充到柱中以进行免疫亲和力层析,其中使含有细胞(诸如PBMC)的样本与柱的基质接触并随后从其洗脱或释放。

[0334] 温育通常在这样的条件下进行,其中特异性结合附着于磁性颗粒或珠的抗体或结合伴侣的抗体或结合伴侣特异性结合细胞表面分子(如果存在于样本内的细胞上的话)。

[0335] 在一些方面,将样本放置在磁场中,并且具有附着于其上的磁响应性或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体上并且与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引到磁体的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在相同的选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或经受进一步的分离步骤。

[0336] 在一些实施方案中,磁响应性颗粒保持附着于随后将被温育和/或培养的细胞。在一些方面,颗粒保持附着于细胞以施用给患者。在一些实施方案中,从细胞中去除可磁化或磁响应性颗粒。从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可裂解连接子缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0337] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotech,Auburn,CA)。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择其上附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,以其中非靶和靶物质在施用外部磁场之后依次洗脱的模式操作MACS。即,附着于磁化颗粒的细胞被保持在适当位置,而未附着的物质被洗脱。然后,在该第一洗脱步骤完成之后,被捕获在磁场中并且被阻止洗脱的物质以某种方式被释放,使得它们可被洗脱和回收。在某些实施方案中,标记非靶细胞并从异质细胞群体中去除。

[0338] 在任何此类实施方案中的一些实施方案中,方法包括在富集(诸如选择和/或分离)NK细胞或其亚群之前向受试者施用IL-12、IL-15、IL-18、IL-2和/或CCL5。

[0339] 在所提供方法的实施方案中,在饲养细胞的存在下温育或培养富集的NK细胞,诸如在支持NK细胞亚群,并且特别是g-NK细胞亚群的增殖和扩增的条件下。

[0340] 在具体方面,饲养细胞包括刺激或促进NKG2C^{阳性}的扩增和/或抑制NKG2A^{阳性}细胞的扩增的细胞。在一些实施方案中,饲养细胞是表达HLA-E或含有HLA-A2信号序列的杂合HLA-E或者用其转染的细胞。例如,这种杂合的示例是含有MHC I类(诸如HLA-A2)启动子和信号序列以及HLA-E成熟蛋白质序列的AEH杂合基因,在一些情况下,该杂合基因可产生与由HLA-E基因编码的成熟蛋白质相同但可在细胞表面稳定表达的成熟蛋白质(参见例如Lee等人,1998年,Journal of Immunology,第160卷:第4951-4960页)。在一些实施方案中,细胞是LCL 721.221、K562细胞或RMA-S细胞,其被转染以表达在MHC I类(诸如HLA-A2)前导序列

的存在下稳定的MHC-E分子。被工程化以表达在MHC I类诸如HLA-A2前导序列肽的存在下稳定的细胞表面HLA-E的细胞系是本领域已知的(Lee等人,1998年,Journal of Immunology,第160卷:第4951-4960页;Zhongguo等人,2005年,第13卷:第464-467页;Garcia等人,2002年,Eur J.Immunol.,第32卷:第936-944页)。在一些实施方案中,221.AEH细胞,诸如经辐照的221.AEH细胞,可用作饲养细胞,或任何其他表达HLA-E的细胞系或在其他方面呈HLA阴性的经辐照的表达HLA-E的细胞系,诸如K562。在一些实施方案中,细胞系可被转染以表达HLA-E。在一些实施方案中,表达膜结合IL-15(K562-mb15)或膜结合IL-21(K562-mb21)的K562细胞可用作饲养细胞。用于本文提供的方法的这种细胞系的示例是221-AEH细胞。

[0341] 在实施方案中,在使用之前将表达HLA的饲养细胞冷冻保存并解冻。在一些实施方案中,如果细胞已被转染以表达HLA-E诸如221.AEH细胞,则细胞可在合适的营养物(例如包括血清或其他合适的血清替代物)和选择剂的存在下生长,然后将它们用于该方法中。例如,在221.AEH细胞的情况下,可在补充有潮霉素B(例如0.1%至10%,诸如为或为约1%)的细胞培养基中培养细胞以维持对细胞的选择压力,从而维持高水平的质粒HLA-E。细胞可维持在 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^6 个细胞/mL的密度直至使用。

[0342] 在具体实施方案中,添加到培养物中的表达HLA-E的饲养细胞,例如221.AEH细胞,是非分裂的,诸如通过X-射线照射或 γ 照射。表达HLA-E的饲养细胞,例如221.AEH,可在它们用于所提供方法的当天或之前进行辐照。在一些实施方案中,表达HLA-E的饲养细胞用范围为约1000rad至10000rad,诸如1000rad至5000rad的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些实施方案中,表达HLA-E的饲养细胞用范围为约10Gy至100Gy,诸如10Gy至50Gy的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些实施方案中,以100Gy辐照细胞。在其他实施方案中,通过x射线照射进行照射。在一些实施方案中,表达HLA-E的饲养细胞用范围为约10Gy至100Gy,诸如10Gy至50Gy的x射线辐照以防止细胞分裂。在一些实施方案中,A Rad-SureTM血液照射指示剂可用于提供照射的阳性视觉验证。在所提供方法的方面,从未去除饲养细胞;作为照射的结果,NK细胞将直接对饲养细胞具有细胞毒性,并且饲养细胞将在培养期间死亡。

[0343] 在一些实施方案中,将富集的、选择的和/或分离的NK细胞在表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的存在下温育或培养,饲养细胞与富集的NK细胞的比例大于或为约1:10的HLA-E饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)与富集的NK细胞的比例,诸如此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例为或为约1:10以及为或为约10:1。

[0344] 在一些实施方案中,表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例,其为或为约1:10至为或为约10:1之间、为或为约1:10至为或为约5:1之间、为或为约1:10至为或为约2.5:1之间、为或为约1:10至为或为约1:1之间、为或为约1:10至为或为约1:2.5之间、为或为约1:10至为或为约1:5之间、为或为约1:5至为或为约10:1之间、为或为约1:5至为或为约5:1之间、为或为约1:5至为或为约2.5:1之间、为或为约1:5至为或为约1:1之间、为或为约1:5至为或为约1:2.5之间、为或为约1:2.5至为或为约10:1之间、为或为约1:2.5至为或为约5:1之间、为或为约1:2.5至为或为约2.5:1之间、为或为约1:2.5至为或为约1:1之间、为或为约1:1至为或为约10:1之间、为或为约1:1至为或为约5:1之间、为或为约1:1至为或为约3:1之间、为或为约1:1至为或为约2.5:1之间、为或为约2.5:1至为或为约10:1之间、为或为约2.5:1至为或为约5:1

之间、或者为或为约5:1至为或为约10:1之间,各自包括端值在内。

[0345] 在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例,其为或为约1.25:1、1.5:1、1.75:1、2.0:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3.0:1、3.25:1、3.5.:1、3.75:1、4.0:1、4.25:1、4.5:1、4.75:1或5:1、或任何前述之间的任何值。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是此类饲养细胞与富集细胞的比例,其为小于或小于约5:1。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是为或为约1:1至2.5:1之间的比例,包括端值在内。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是为或为约2.5:1的比例。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(诸如其经辐照群体)的比例是为或为约2:1的比例。

[0346] 在一些情况下,如果起始NK细胞群体在扩增前已被冷冻保存,即经受冷冻/解冻,则可采用比使用新鲜NK细胞的方法更低的221.AEH与NK细胞的比例。在此处发现,1:1的221.AEH与冷冻/解冻NK细胞的比例导致在含有2.5:1的221.AEH与新鲜NK细胞的比例的培养物中的可比较的扩增。在一些方面,较低比例确保了培养物中较高数量的NK细胞以允许更多的细胞至细胞接触,这可在促进初始生长和扩增中起作用。在一些实施方案中,如果来自样本的初始富集的NK细胞群体已经受冷冻/解冻,则使用为或为约2:1至1:2的221.AEH与冷冻/解冻NK细胞的比例。在具体实施方案中,该比例为1:1。应当理解,可使用较高比例,诸如2.5:1的221.AEH与冷冻/解冻NK细胞,但是这可能需要较长的培养时间,例如为或为约21天,以达到期望的阈值密度或数量。

[0347] 在一些实施方案中,通过向培养物中进一步添加非分裂的外周血单核细胞(PBMC)来扩增NK细胞。在一些方面,非分裂的饲养细胞可包含经X射线辐照的PBMC饲养细胞。在一些方面,非分裂的饲养细胞可包含经 γ 辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,PBMC用范围为约1000rad至10000rad,诸如1000rad至5000rad的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些实施方案中,PBMC用范围为约10Gy至100Gy,诸如10Gy至50Gy的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些方面,在温育的至少一部分期间,经辐照的饲养细胞与非分裂的(例如经辐照的)表达HLA-E的饲养细胞同时存在于培养基中。在一些方面,将非分裂的(例如经辐照的)PBMC饲养细胞、表达HLA-E的饲养细胞和富集的NK细胞在同一天添加到培养物中,诸如在培养开始的那天,例如为或为约或接近相同时间。

[0348] 在一些实施方案中,温育或培养进一步在经辐照的PBMC作为饲养细胞的存在下进行。在一些实施方案中,经辐照的PBMC饲养细胞与分离或选择的富集的NK细胞的受试者是自体同源的或者来自同一受试者。在具体实施方案中,PBMC获自与用于富集NK细胞相同的生物样本,例如全血或白细胞单采血液成分或单采血液成分产物。一旦获得,就在如上所述富集NK细胞前保留一部分PBMC用于辐射。

[0349] 在一些实施方案中,经辐照的PBMC以此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例为以下项作为饲养细胞存在:为或为约1:10至为或为约10:1、为或为约1:10至为或为约5:1、为或为约1:10至为或为约2.5:1、为或为约1:10至为或为约1:1、为或为约1:10至为或为约1:2.5、为或为约1:10至为或为约1:5、为或为约1:5至为或为约10:1、为或为约1:5至为或为约5:1、为或为约1:5至为或为约2.5:1、为或为约1:5至为或为约1:1、为或为约1:5至为或为约

1:2.5、为或为约1:2.5至为或为约10:1、为或为约1:2.5至为或为约5:1、为或为约1:2.5至为或为约2.5:1、为或为约1:2.5至为或为约1:1、为或为约1:1至为或为约10:1、为或为约1:1至为或为约5:1、为或为约1:1至为或为约2.5:1、为或为约2.5:1至为或为约10:1、为或为约2.5:1至为或为约5:1、或者为或为约5:1至为或为约10:1。

[0350] 在一些实施方案中,经辐照的PBMC以此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例为以下项作为饲养细胞存在:为或为约1:1至为或为约5:1之间,诸如为或为约1.25:1、1.5:1、1.75:1、2.0:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3.0:1、3.25:1、3.5.:1、3.75:1、4.0:1、4.25:1、4.5:1、4.75:1或5:1、或任何前述之间的任何值。在一些实施方案中,经辐照的PBMC以此类饲养细胞与富集的NK细胞的比例为或为约5:1存在。

[0351] 在具体实施方案中,在温育或培养的至少一部分期间,激活经辐照的PBMC的一种或多种细胞或细胞类型(诸如T细胞),并且/或者在能够刺激PBMC饲养细胞的一种或多种T细胞的激活的至少一种刺激剂的存在下进行温育或培养。在一些实施方案中,至少一种刺激剂特异性结合TCR复合物的成员。在一些实施方案中,该至少一种刺激剂特异性结合CD3,任选CD3 ϵ 。在一些方面,该至少一种刺激剂是抗CD3抗体或抗原结合片段。示例性抗CD3抗体包括小鼠抗人CD3(OKT3)。

[0352] 在一些实施方案中,在包括经辐照的PBMC饲养细胞的温育的至少一部分期间存在抗CD3抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,将抗CD3抗体或抗原结合片段与经辐照的PBMC同时或大约同时添加到培养物或温育物中。例如,在温育或培养开始时或大约开始时添加抗CD3抗体或抗原结合片段。在具体方面,在培养或温育过程期间可去除抗CD3抗体或抗原结合片段,或降低其浓度,诸如通过交换或冲洗培养基。在具体实施方案中,在交换或洗涤之后,这些方法不包括用抗CD3抗体或抗原结合片段回加或补充培养基。

[0353] 在一些实施方案中,在培养或温育的至少一部分期间添加或存在的抗CD3抗体或抗原结合片段的浓度在为或为约10ng/mL至为或约5 μ g/mL之间,诸如为或为约10ng/mL至为或约2 μ g/mL之间、为或为约10ng/mL至为或约1 μ g/mL之间、为或为约10ng/mL至为或约500ng/mL之间、为或为约10ng/mL至为或约100ng/mL之间、为或为约10ng/mL至为或约50ng/mL之间、为或为约50ng/mL至为或约5 μ g/mL之间、诸如为或为约50ng/mL至为或约2 μ g/mL之间、为或为约50ng/mL至为或约1 μ g/mL之间、为或为约50ng/mL至为或约500ng/mL之间、为或为约50ng/mL至为或约100ng/mL之间、为或为约100ng/mL至为或约5 μ g/mL之间、为或为约100ng/mL至为或约2 μ g/mL之间、为或为约100ng/mL至为或约1 μ g/mL之间、为或为约100ng/mL至为或约500ng/mL之间、为或为约500ng/mL至为或约5 μ g/mL之间、为或为约500ng/mL至为或约2 μ g/mL之间、为或为约500ng/mL至为或约1 μ g/mL之间、为或为约1 μ g/mL至为或约5 μ g/mL之间、为或为约1 μ g/mL至为或约2 μ g/mL之间、或者为或为约2 μ g/mL至为或约5 μ g/mL之间,各自包括端值在内。在一些实施方案中,抗CD3抗体或抗原结合片段的浓度为或为约10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL或100ng/mL、或任何前述之间的任何值。在一些实施方案中,抗CD3抗体或抗原结合片段的浓度为或为约50ng/mL。

[0354] 在一些实施方案中,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白(Ig)分子的抗原结合部分或片段,即包含特异性结合抗原(与其进行免疫反应)的抗原结合位点的分子。术语抗体不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段,诸如dAb、Fab、Fab'、F

(ab')₂、Fv)、单链(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。通常,“抗原结合片段”包含与目标抗原的至少一个表位结合的免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR。就这一点而言,抗原结合片段可包含来自结合抗原的抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)序列的1、2、3、4、5或全部6个CDR,诸如对于含有VH和VL的抗体通常为六个CDR(对于重链和轻链中的每一者为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”),或对于含有单个可变结构域的抗体为三个CDR。

[0355] “抗体片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的一部分、结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的示例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子诸如scFv和单结构域V_H单抗;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在具体实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,诸如scFv。

[0356] 在一些实施方案中,在此类富集的NK细胞,诸如选择的和/或分离的NK细胞的存在下,开始温育或培养,浓度为或为约,或者至少为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL,为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL,为或为约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL,为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL,或者为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL。在所提供方法的实施方案中,在此类富集的NK细胞,诸如选择的和/或分离的NK细胞的存在下,开始温育或培养,浓度为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL,诸如为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.1×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL、为或为约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL,各自包括端值在内。在一些实施方案中,在此类富集的NK细胞,诸如选择的和/或分离的NK细胞的存在下,开始温育或培养,浓度为或为约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL。

[0357] 在任何此类实施方案中的一些实施方案中,在温育或培养开始时添加或存在的富集的NK细胞的量,诸如如上所述的选自或分离自PBMC的富集的NK细胞的量是至少为或至少为约 1×10^5 个细胞、至少为或至少为约 2×10^5 个细胞、至少为或至少为约 3×10^5 个细胞、至少为或至少为约 4×10^5 个细胞、至少为或至少为约 5×10^5 个细胞、至少为或至少为约 6×10^5 个细胞、至少为或至少为约 7×10^5 个细胞、至少为或至少为约 8×10^5 个细胞、至少为或至少为约 9×10^5 个细胞、至少为或至少为约 1×10^6 个细胞或更多。在具体实施方案中,富集的NK细胞的量,诸如如上所述选自或分离自PBMC的富集的NK细胞的量,是至少为或为约至少或者为或为约 1×10^6 个细胞。

[0360] 在一些实施方案中,富集的NK细胞群体中g-NK细胞的百分比在为或为约20%至为或为约90%之间、为或为约20%至为或为约80%之间、为或为约20%至为或为约70%之间、为或为约20%至为或为约60%之间、为或为约20%至为或为约50%之间、为或为约20%至为或为约40%之间、为或为约20%至为或为约30%之间、为或为约30%至为或为约90%之间、为或为约30%至为或为约80%之间、为或为约30%至为或为约70%之间、为或为约30%至为或为约60%之间、为或为约30%至为或为约50%之间、为或为约30%至为或为约40%之间、为或为约40%至为或为约90%之间、为或为约40%至为或为约80%之间、为或为约40%至为或为约70%之间、为或为约40%至为或为约60%之间、为或为约40%至为或为约50%之间、为或为约50%至为或为约90%之间、为或为约50%至为或为约80%之间、为或为约50%至为或为约70%之间、为或为约50%至为或为约60%之间、为或为约60%至为或为约90%之间、为或为约60%至为或为约80%之间、为或为约60%至为或为约70%之间、为或为约70%至为或为约90%之间、为或为约70%至为或为约80%之间、或者为或为约80%至为或为约90%之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞群体中g-NK细胞的百分比为或为约20%至为或为约90%。在一些实施方案中,富集的NK细胞群体中g-NK细胞的百分比为或为约40%至为或为约90%。在一些实施方案中,富集的NK细胞群体中g-NK细胞的百分比为或为约60%至为或为约90%。

[0361] 在这些实施方案的一些实施方案中,NK细胞可与生长因子一起培养。根据一些实施方案,该至少一种生长因子包括选自SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18和IL-21的生长因子。根据一些实施方案,该至少一种生长因子是IL-2或IL-7和IL-15。根据一些实施方案,该至少一种生长因子是IL-2、IL-21或IL-7和IL-15。在一些实施方案中,生长因子是重组细胞因子,诸如重组IL-2、重组IL-7、重组IL-21或重组IL-15。

[0362] 在一些实施方案中,在一种或多种重组细胞因子的存在下培养NK细胞。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子包括SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27中的任一者或它们的组合。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27中的任一者或它们的组合。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子中的至少一者是IL-21。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子还包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18或IL-27或它们的组合。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子中的至少一者是IL-2。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子至少是IL-2和IL-21。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21和IL-2。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-12、IL-15和IL-18。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-12、IL-15和IL-18。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-15、IL-18和IL-27。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-15、IL-18和IL-27。在一些实施方案中,该一种或多种重组细胞因子是IL-2和IL-15。

[0363] 在具体实施方案中,所提供方法包括在重组IL-2的存在下温育或培养富集的NK细胞和饲养细胞。在一些实施方案中,在温育的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次,重组IL-2以这样的浓度存在,即为或为约1IU/mL至为或为约500IU/mL之间,诸如为或为约1IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约1IU/mL至

为或为约100IU/mL之间、为或为约1IU/mL至为或为约50IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约100IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约250IU/mL之间、或者为或为约250IU/mL至为或为约500IU/mL之间,各自包括端值在内。在一些实施方案中,在温育的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次,IL-2的浓度为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、或任何前述之间的任何值。在具体实施方案中,在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-2的浓度为或为约100IU/mL。在具体实施方案中,在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-2的浓度为或为约500IU/mL。

[0364] 在具体实施方案中,所提供方法包括在重组IL-21的存在下温育或培养富集的NK细胞和饲养细胞。在一些实施方案中,在温育的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次,重组IL-21以这样的浓度存在,即为或为约1IU/mL至为或为约500IU/mL之间,诸如为或为约1IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约1IU/mL至为或为约100IU/mL之间、为或为约1IU/mL至为或为约50IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约100IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约250IU/mL之间、或者为或为约250IU/mL至为或为约500IU/mL之间,各自包括端值在内。在一些实施方案中,在温育的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次,IL-21的浓度为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、或任何前述之间的任何值。在具体实施方案中,在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-21的浓度为或为约100IU/mL。

[0365] 在具体实施方案中,所提供方法包括在重组IL-21的存在下温育或培养富集的NK细胞和饲养细胞。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL、约10ng/mL至约90ng/mL、约10ng/mL至约80ng/mL、约10ng/mL至约70ng/mL、约10ng/mL至约60ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约100ng/mL、约20ng/mL至约90ng/mL、约20ng/mL至约80ng/mL、约20ng/mL至约70ng/mL、约20ng/mL至约60ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约100ng/mL、约30ng/mL至约90ng/mL、约30ng/mL至约80ng/mL、约30ng/mL至约70ng/mL、约30ng/mL至约60ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、约40ng/mL至约100ng/mL、约40ng/mL至约90ng/mL、约40ng/mL至约80ng/mL、约40ng/mL至约70ng/mL、约40ng/mL至约60ng/mL、约40ng/mL至约50ng/mL、约50ng/mL至约100ng/mL、约50ng/mL至约90ng/mL、约50ng/mL至约80ng/mL、约50ng/mL至约70ng/mL、约50ng/mL至约60ng/mL、约60ng/mL至约100ng/mL、约60ng/mL至约90ng/mL、约60ng/mL至约80ng/mL、约60ng/mL至约70ng/mL、约70ng/mL至约100ng/mL、约70ng/mL至约90ng/mL、约70ng/mL至约80ng/mL、约80ng/mL至约100ng/mL、约80ng/mL至约90ng/mL、或约90ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,在培

养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-21的浓度为或为约25ng/mL。

[0366] 在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-15的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或者约40ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-15的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-15的浓度为或为约10ng/mL。

[0367] 在具体实施方案中,这些方法包括在IL-2、IL-15和IL-21存在下进行培养。在所提供方法的实施方案中,例如在培养开始时并且任选地在培养期间一次或多次添加到培养物中的重组细胞因子的浓度为或为约50IU/mL至为或为约500IU/mL IL-2,诸如为或为约100IU/mL至为或为约500IU/mL IL-2;为或为约1ng/mL至为或为约50ng/mL IL-15,诸如为或为约10ng/mL;以及为或为约10ng/mL至为或为约100ng/mL IL-21,诸如为或为约25ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间添加,诸如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间添加,诸如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次100IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21。

[0368] 在一些实施方案中,所提供方法包括在重组IL-21存在下温育或培养富集的NK细胞和饲养细胞,并且将重组IL-21作为与抗IL-21抗体的复合物添加。在一些实施方案中,在培养前,使抗IL-21抗体与重组IL-21接触,从而形成IL-21/抗IL-21复合物,并将IL-21/抗IL-21复合物添加到培养基中。在一些实施方案中,使重组IL-21和抗IL-21抗体接触以形成IL-21/抗IL-21复合物在包括适于形成复合物的温度和时间的条件下进行。在一些实施方案中,培养在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ 下进行30分钟。

[0369] 在一些实施方案中,以为或为约100ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约400ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约300ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约200ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约400ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约300ng/mL、为或为约300ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约300ng/mL至为或为约400ng/mL、或者为或为约400ng/mL至为或为约500ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以为或为约100ng/mL至为或为约500ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以250ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。

[0370] 在具体实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL、约10ng/mL至约90ng/mL、约10ng/mL至约80ng/mL、约10ng/mL至约

70ng/mL、约10ng/mL至约60ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约100ng/mL、约20ng/mL至约90ng/mL、约20ng/mL至约80ng/mL、约20ng/mL至约70ng/mL、约20ng/mL至约60ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约100ng/mL、约30ng/mL至约90ng/mL、约30ng/mL至约80ng/mL、约30ng/mL至约70ng/mL、约30ng/mL至约60ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、约40ng/mL至约100ng/mL、约40ng/mL至约90ng/mL、约40ng/mL至约80ng/mL、约40ng/mL至约70ng/mL、约40ng/mL至约60ng/mL、约40ng/mL至约50ng/mL、约50ng/mL至约100ng/mL、约50ng/mL至约90ng/mL、约50ng/mL至约80ng/mL、约50ng/mL至约70ng/mL、约50ng/mL至约60ng/mL、约60ng/mL至约100ng/mL、约60ng/mL至约90ng/mL、约60ng/mL至约80ng/mL、约60ng/mL至约70ng/mL、约70ng/mL至约100ng/mL、约70ng/mL至约90ng/mL、约70ng/mL至约80ng/mL、约80ng/mL至约100ng/mL、约80ng/mL至约90ng/mL、或约90ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为或为约25ng/mL。

[0371] 在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-12的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或者约40ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-12的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-12的浓度为或为约10ng/mL。

[0372] 在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-18的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或者约40ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-18的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-18的浓度为或为约10ng/mL。

[0373] 在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-27的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约

40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或者约40ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-27的浓度为约1ng/mL至约50ng/mL。在具体实施方案中,在培养的至少一部分期间,例如在培养开始时添加并且任选地在培养期间添加一次或多次的重组IL-27的浓度为或为约10ng/mL。

[0374] 在一些实施方案中,这些方法包括交换培养基,在一些方面,该培养基包括洗涤细胞。例如,在培养或温育的至少一部分期间,可间歇地更换或冲洗培养基,诸如每天、每隔一天、每三天或每周一次。在具体实施方案中,在培养开始之后为或为约3天至7天内开始更换或冲洗培养基,诸如在或约在第3天、第4天、第5天、第6天或第7天。在具体实施方案中,在或约在第5天开始时更换或冲洗培养基。例如,在第5天和之后每2至3天更换培养基。

[0375] 一旦去除或冲洗培养基,就补充培养基。在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如如上所述的任何生长因子或细胞因子。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加该一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2、IL-15和/或IL-21。在一些此类方面,该一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2、IL-15和/或IL-21,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将该一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2、IL-15和/或IL-21,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用该一种或多种生长因子或细胞因子(诸如重组IL-2、IL-15和/或IL-21)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加该一种或多种生长因子或细胞因子,例如重组IL-2、IL-15和/或IL-21。

[0376] 在具体实施方案中,在IL-2、IL-15和IL-21中的至少一者的存在下进行培养,并且补充培养基以包括IL-2、IL-15和IL-21中的至少一者。在一些实施方案中,在IL-2和IL-21的存在下进行培养,并且补充培养基以包括IL-2和IL-21。在一些实施方案中,在IL-2和IL-15的存在下进行培养,并且补充培养基以包括IL-2和IL-15。在一些实施方案中,在IL-15和IL-21的存在下进行培养,并且补充培养基以包括IL-15和IL21。在一些实施方案中,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下进行培养,并且补充培养基以包括IL-2、IL-15和IL-21。在一些实施方案中,一种或多种另外的细胞因子可用于NK细胞的扩增,包括但不限于重组IL-18、重组IL-7和/或重组IL-12。

[0377] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子(诸如重组IL-2)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-2,在第0天开始(温育开始)添加

到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-2)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-2。在任何此类实施方案中,将重组IL-2以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即为或为约1IU/mL至为或为约500IU/mL之间,诸如以为或为约1IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约1IU/mL至为或为约100IU/mL之间、为或为约1IU/mL至为或为约50IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约250IU/mL之间、为或为约50IU/mL至为或为约100IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约500IU/mL之间、为或为约100IU/mL至为或为约250IU/mL之间、或者为或为约250IU/mL至为或为约500IU/mL之间,各自包括端值在内。在一些实施方案中,将重组IL-2以为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、或任何前述之间的任何值添加到培养物或温育物中。在具体实施方案中,重组IL-2的浓度为或为约100IU/mL。在具体实施方案中,重组IL-2的浓度为或为约500IU/mL。

[0378] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-21。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子(诸如重组IL-21)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-21,在或在约培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-21,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-21)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-21。在任何此类实施方案中,将重组IL-21以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即约10ng/mL至约100ng/mL、约10ng/mL至约90ng/mL、约10ng/mL至约80ng/mL、约10ng/mL至约70ng/mL、约10ng/mL至约60ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约100ng/mL、约20ng/mL至约90ng/mL、约20ng/mL至约80ng/mL、约20ng/mL至约70ng/mL、约20ng/mL至约60ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约100ng/mL、约30ng/mL至约90ng/mL、约30ng/mL至约80ng/mL、约30ng/mL至约70ng/mL、约30ng/mL至约60ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、约40ng/mL至约100ng/mL、约40ng/mL至约90ng/mL、约40ng/mL至约80ng/mL、约40ng/mL至约70ng/mL、约40ng/mL至约60ng/mL、约40ng/mL至约50ng/mL、约50ng/mL至约100ng/mL、约50ng/mL至约90ng/mL、约50ng/mL至约80ng/mL、约50ng/mL至约70ng/mL、约50ng/mL至约60ng/mL、约60ng/mL至约100ng/mL、约60ng/mL至约90ng/mL、约60ng/mL至约80ng/mL、约60ng/mL至约70ng/mL、约70ng/mL至约100ng/mL、约70ng/mL至约90ng/mL、约70ng/mL至约80ng/mL、约80ng/mL至约100ng/mL、约80ng/mL至约90ng/mL、或约90ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,将重组IL-21以约10ng/mL至约100ng/mL(包括端值在内)的浓度添加到培养物或温育物中。将重组IL-21以为或为约25ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。

[0379] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-21,其作为与抗体(诸如抗IL-21抗体)的复合物添加。因此,在一些实施方案中,复合物,诸如IL-21/抗IL-21抗体复合物,在温育或培养期间立即添加。在一些此类方面,复合物,诸如IL-21/抗IL-21抗体复合物,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将复合物,诸如IL-21/抗IL-21抗体复合物,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用复合物(诸如IL-21/抗IL-21抗体复合物)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加复合物,诸如IL-21/抗IL-21抗体复合物。在任何此类实施方案中,使抗IL-21抗体与重组IL-21接触,从而形成IL-21/抗IL-21复合物,并将IL-21/抗IL-21复合物添加到培养基中。在任何此类实施方案中,使重组IL-21和抗IL-21抗体接触以形成IL-21/抗IL-21复合物在包括适于形成复合物的温度和时间的条件下进行。在任何此类实施方案中,培养在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ 下进行30分钟。在任何此类实施方案中,以为或为约100ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约400ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约300ng/mL、为或为约100ng/mL至为或为约200ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约400ng/mL、为或为约200ng/mL至为或为约300ng/mL、为或为约300ng/mL至为或为约500ng/mL、为或为约300ng/mL至为或为约400ng/mL、或者为或为约400ng/mL至为或为约500ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以为或为约100ng/mL至为或为约500ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以250ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在任何此类实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL、约10ng/mL至约90ng/mL、约10ng/mL至约80ng/mL、约10ng/mL至约70ng/mL、约10ng/mL至约60ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约100ng/mL、约20ng/mL至约90ng/mL、约20ng/mL至约80ng/mL、约20ng/mL至约70ng/mL、约20ng/mL至约60ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约100ng/mL、约30ng/mL至约90ng/mL、约30ng/mL至约80ng/mL、约30ng/mL至约70ng/mL、约30ng/mL至约60ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、约40ng/mL至约100ng/mL、约40ng/mL至约90ng/mL、约40ng/mL至约80ng/mL、约40ng/mL至约70ng/mL、约40ng/mL至约60ng/mL、约40ng/mL至约50ng/mL、约50ng/mL至约100ng/mL、约50ng/mL至约90ng/mL、约50ng/mL至约80ng/mL、约50ng/mL至约70ng/mL、约50ng/mL至约60ng/mL、约60ng/mL至约100ng/mL、约60ng/mL至约90ng/mL、约60ng/mL至约80ng/mL、约60ng/mL至约70ng/mL、约70ng/mL至约100ng/mL、约70ng/mL至约90ng/mL、约70ng/mL至约80ng/mL、约80ng/mL至约100ng/mL、约80ng/mL至约90ng/mL、或约90ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为约10ng/mL至约100ng/mL,包括端值在内。在具体实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为或为约25ng/mL。

[0380] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-15。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子

(诸如重组IL-15)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-15,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-15,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-15)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-15。在任何此类实施方案中,将重组IL-15以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或约40ng/mL至约50ng/mL。在任何此类实施方案中,将重组IL-15以约1ng/mL至约50ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。在任何此类实施方案中,将重组IL-15以为或为约10ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。在具体实施方案中,将500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21添加到培养物或温育物中。

[0381] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-12。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子(诸如重组IL-12)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-12,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-12,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-12)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-12。在任何此类实施方案中,将重组IL-12以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或约40ng/mL至约50ng/mL。在任何此类实施方案中,将重组IL-12以约1ng/mL至约50ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。在任何此类实施方案中,将重组IL-12以为或为约10ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。

[0382] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-18。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子(诸如重组IL-18)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-18,在或约在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添

加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-18,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-18)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-18。在任何此类实施方案中,将重组IL-18以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或约40ng/mL至约50ng/mL。在任何此类实施方案中,将重组IL-18以约1ng/mL至约50ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。在任何此类实施方案中,将重组IL-18以为或为约10ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。

[0383] 在一些实施方案中,所补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,诸如重组IL-27。因此,在一些实施方案中,在温育或培养期间间歇地添加生长因子或细胞因子(诸如重组IL-27)。在一些此类方面,生长因子或细胞因子,诸如重组IL-27,在或在培养或温育开始时添加,然后在培养或温育期间间歇地添加,诸如每次更换或冲洗培养基时添加。在一些实施方案中,将生长因子或细胞因子,诸如重组IL-27,在第0天开始(温育开始)添加到培养物或温育物中,并且在每次更换或冲洗培养基时,进一步添加以用生长因子或细胞因子(诸如重组IL-27)补充培养物或温育物。在一些实施方案中,这些方法包括在培养开始(第0天)时,并且在培养期间在每次洗涤或更换培养基时每两天或三天,例如在或在约培养或温育的第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-27。在任何此类实施方案中,将重组IL-27以这样的浓度添加到培养物或温育物中,即约1ng/mL至约50ng/mL、约1ng/mL至约40ng/mL、约1ng/mL至约30ng/mL、约1ng/mL至约20ng/mL、约1ng/mL至约10ng/mL、约1ng/mL至约5ng/mL、约5ng/mL至约50ng/mL、约5ng/mL至约40ng/mL、约5ng/mL至约30ng/mL、约5ng/mL至约20ng/mL、约5ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约50ng/mL、约10ng/mL至约40ng/mL、约10ng/mL至约30ng/mL、约10ng/mL至约20ng/mL、约20ng/mL至约50ng/mL、约20ng/mL至约40ng/mL、约20ng/mL至约30ng/mL、约30ng/mL至约50ng/mL、约30ng/mL至约40ng/mL、或约40ng/mL至约50ng/mL。在任何此类实施方案中,将重组IL-27以约1ng/mL至约50ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。在任何此类实施方案中,将重组IL-27以为或为约10ng/mL的浓度添加到培养物或温育物中。

[0384] 在所提供方法的实施方案中,培养或温育包括提供NK细胞维持所需或有用的化学和物理条件(例如,温度、气体)。可支持NK细胞增殖或扩增的化学条件的示例包括但不限于通常在生长(即,培养)培养基中提供的缓冲液、营养物、血清、维生素和抗生素。在一个实施方案中,NK培养基包括含有10% FCS的MEM α 或含有5%人血清/LiforCell[®] FBS替代物(Lifeblood Products)的CellGro SCGM(Cell Genix)。适用于本发明的其他培养基包括但不限于Glasgow培养基(Gibco Carlsbad Calif.)、RPMI培养基(Sigma-Aldrich, St Louis Mo.)或DMEM(Sigma-Aldrich, St Louis Mo.)。应当注意,许多培养基包含烟酰胺作为维生素

补充剂,例如MEM α (8.19 μ M烟酰胺)、RPMI (8.19 μ M烟酰胺)、DMEM (32.78 μ M烟酰胺)和Glasgow培养基(16.39 μ M烟酰胺)。

[0385] 在一些实施方案中,诸如对于其中将细胞引入(或再引入)人受试者中的应用,使用无血清制剂进行培养,诸如用于淋巴细胞培养的AIM VTM无血清培养基、MARROWMAXTM骨髓培养基或无血清干细胞生长培养基(SCGM)(例如CellGenix[®] GMP SCGM)。此类培养基制剂和补充剂可从商业来源获得。可向培养物中补充氨基酸、抗生素和/或所述的其他生长因子细胞因子以促进最佳生存力、增殖、功能性和/或存活。在一些实施方案中,无血清培养基还可补充有低百分比的人血清,诸如0.5%至10%的人血清,诸如为或为约5%的人血清。在此类实施方案中,人血清可以是来自人AB血浆的人血清(人AB血清)或自体血清。

[0386] 在一些实施方案中,用饲养细胞和任选的细胞因子(例如重组IL-2或IL-21)的培养在包括适于人NK细胞生长或扩增的温度的条件下进行,例如至少约25摄氏度,通常至少约30摄氏度,并且通常为或为约37摄氏度。在一些实施方案中,培养在37 $^{\circ}$ C \pm 2下在5%CO₂中进行。

[0387] 在所提供方法的实施方案中,培养包括在GMP条件下进行的温育。在一些实施方案中,温育在封闭系统中进行,在一些方面,该封闭系统可以是封闭自动化系统。在一些实施方案中,含有该一种或多种重组细胞因子或生长因子的培养基是无血清培养基。在一些实施方案中,在封闭自动化系统中用无血清培养基进行温育。

[0388] 在一些实施方案中,在适于细胞扩增的培养容器中进行NK细胞的扩增。在一些实施方案中,培养容器是透气性培养容器,诸如G-Rex系统(例如G-Rex 10、G-Rex 10M、G-Rex 100M/100M-CS或G-Rex 500M/500M-CS)。在一些实施方案中,培养容器是微孔板、烧瓶、袋或适于在封闭系统中扩增细胞的其他培养容器。在一些实施方案中,扩增可在生物反应器中进行。在一些实施方案中,使用细胞扩增系统通过将细胞转移到透气袋来进行扩增,诸如与生物反应室连接(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))。在实施方案中,细胞扩增系统包括培养容器,诸如袋,例如可透气的细胞袋,其体积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L、或任何前述之间的任何值。在一些实施方案中,该过程是自动化或半自动化的。在一些方面,在静态条件下进行扩增培养。在一些实施方案中,在摇动条件下进行扩增培养。培养基可以团状添加或可按灌注时间表添加。在一些实施方案中,生物反应器将温度维持在或接近37 $^{\circ}$ C,并且将CO₂水平维持在或接近5%,其中稳定空气流为、为约或至少为0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中,培养的至少一部分用灌注进行,诸如以290mL/天、580mL/天和/或1160mL/天的速率进行。

[0389] 在一些方面,在能够灌注的自动封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可向细胞中连续添加培养基以确保实现最佳生长速率。

[0390] 可在GMP条件下进行扩增方法,包括在封闭自动化系统中并使用无血清培养基。在一些实施方案中,可在封闭系统中或在GMP条件下进行该方法的任一个或多个步骤。在某些实施方案中,在GMP套件中进行所有过程操作。在一些实施方案中,封闭系统用于进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中,处理步骤中的一个或多个或全部步骤,例如,分离、选择和/或富集、处理、培养步骤(包括与细胞扩

增相关的温育)、以及配制步骤,使用整合或自含系统中的系统、装置或设备,以及/或者以自动化或可编程方式进行。在一些方面,系统或设备包括与系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户编程、控制、评估处理、分离、工程化和配制步骤的结果和/或调整它们的各个方面。

[0391] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,培养进行到该方法实现扩增至少或至少约 2.50×10^8 个g-NK细胞的时间。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,培养进行到该方法实现扩增至少或至少约 5.0×10^8 个g-NK细胞的时间。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,培养进行到该方法实现扩增至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,培养进行到该方法实现扩增至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞的时间。

[0392] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,培养进行为或为约或至少为或至少为约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些实施方案中,培养进行为或为约或至少为或为约14天。在一些实施方案中,培养进行为或为约或至少为或为约21天。

[0393] 在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或温育进行为或为约或至少为或至少为约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些实施方案中,培养进行为或为约或至少为或为约14天。在一些实施方案中,培养进行为或为约或至少为或为约21天。在某些实施方案中,如果富集的NK细胞在培养开始时在已经预先冷冻或冷冻保存之后已经解冻,则更长的培养持续时间通常是必需的。根据因素诸如培养开始时的细胞状态、培养开始时或培养期间的细胞的健康或生存力和/或培养结束时的期望的阈值细胞数量(例如,根据期望的细胞应用,诸如为了治疗目的而施用给受试者的细胞剂量),凭经验确定培养细胞的最佳天数在本领域技术人员的水平内。

[0394] 在培养结束时,收获细胞。可通过在培养结束之后从培养容器中离心细胞来实现细胞的收集或收获。例如,在培养大约14天之后通过离心收获细胞。在收获细胞之后,洗涤细胞。可收集细胞样本用于功能或表型测试。可单独配制未用于功能或表型测试的任何其他细胞。在一些情况下,将细胞与冷冻保护剂一起配制以冷冻保存细胞。

[0395] 在一些实施方案中,所提供方法包括在分离、选择和/或富集之前或之后冷冻(例如冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所提供方法包括在温育和/或培养之前或之后冷冻(例如冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,该方法包括在冷冻保护剂的存在下冷冻保存细胞,从而产生冷冻保存的组合物。在一些方面中,在温育之前和/或在向受试者施用之前,该方法包括在减少或去除冷冻保护剂的条件下载冻冷冻保存的组合物。在一些方面,可使用多种已知冷冻溶液和参数中的任一者。在一些实施方案中,将细胞冷冻(例如低温冷冻或冷冻保存)在培养基和/或溶液中,其中最终浓度为或为约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%或5.0%的DMSO,或1%至15%、6%至12%、5%至10%或6%至8%的DMSO。在具体实施方案中,将细胞冷冻(例如低温冷冻或冷冻保存)在培养基和/或溶液中,其中终浓度为或为约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%或0.25%的HSA,或0.1%至-5%、0.25%至4%、0.5%至2%或1%至2%的HSA。一个示例涉及

使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS或其他合适的细胞冷冻培养基。然后用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以约1°C/分钟的速率冷冻至为或为约-80°C下并储存在液氮储存罐的气相中。在一些实施方案中,在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中冷冻细胞。在一些实施方案中,冷冻保护剂为DMSO。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约5%至为或为约10% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约5% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约6% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约7% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约8% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约9% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基为或为约10% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存培养基含有市售冷冻保存溶液(CryoStor™CS10或CS5)。CryoStor™CS10是含有10%二甲基亚砷(DMSO)的冷冻保存培养基。CryoStor™CS5是含有5%二甲基亚砷(DMSO)的冷冻保存培养基。在一些实施方案中,冷冻保存培养基含有一种或多种另外的赋形剂,诸如血浆A或人血清白蛋白(HSA)。

[0396] 在一些实施方案中,以 5×10^6 至 1×10^8 个细胞/mL的密度冷冻保存细胞。例如,细胞以为或为约 5×10^6 个细胞/mL、为或为约为 10×10^6 个细胞/mL、为或为约 15×10^6 个细胞/mL、为或为约 20×10^6 个细胞/mL、为或为约 25×10^6 个细胞/mL、为或为约 30×10^6 个细胞/mL、为或为约 40×10^6 个细胞/mL、为或为约 50×10^6 个细胞/mL、为或为约 60×10^6 个细胞/mL、为或为约 70×10^6 个细胞/mL、为或为约 80×10^6 个细胞/mL、或者为或为约 90×10^6 个细胞/mL、或任何前述之间的任何值的密度冷冻保存。可将细胞以适于冷冻保存容器的任何体积冷冻保存。在一些实施方案中,将细胞冷冻保存在小瓶中。冷冻保存培养基的体积可为或为约1mL至为或为约50mL,诸如为或为约1mL和5mL。在一些实施方案中,将细胞冷冻保存在袋中。冷冻保存培养基的体积可为或为约10mL至为或为约500mL,诸如为或为约100mL或者为或为约200mL。所收获和扩增的细胞可在低温环境下冷冻保存,诸如-80°C至-196°C的温度。在任何所提供方法中的一些方法中,与培养开始时相比,该方法在培养结束时产生了增加数量的NKG2C^{阳性}细胞。例如,与培养开始时相比,培养结束时NKG2C^{阳性}细胞的增加可大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍、或者大于或大于约800倍。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约1000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2500倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约3000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约5000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约10000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约15000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约20000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约25000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约30000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约35000倍以上。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或温育进行到该方法实现扩增至少为或约 2.50×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 6.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 7.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 8.0×10^8 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 9.0×10^8 个

NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^9 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞、至少为或约 2.5×10^{10} 个NKG2C^{阳性}细胞或更多的时间。

[0397] 在任何所提供方法中的一些方法中,与培养开始时相比,该方法在培养结束时产生了增加数量的NKG2A^{阳性}细胞。例如,与培养开始时相比,培养结束时NKG2A^{阳性}细胞的增加可大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍、或者大于或大于约800倍。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约1000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约3000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约5000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约10000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约15000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约20000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约25000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约30000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约35000倍以上。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或温育进行到该方法实现扩增至少为或约 2.50×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 6.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 7.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 8.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 9.0×10^8 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^9 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^{10} 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^{10} 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^{10} 个NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 2.5×10^{10} 个NKG2A^{阳性}细胞或更多的时间。

[0398] 在任何所提供方法中的一些方法中,与培养开始时相比,该方法在培养结束时产生了增加数量的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞。例如,与培养开始时相比,培养结束时NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞的增加可大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍、或者大于或大于约800倍。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约1000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2500倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约3000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约5000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约10000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约15000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约20000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约25000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约30000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约35000倍以上。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或温育进行到该

方法实现扩增至少为或约 2.50×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 3.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 4.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 5.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 6.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 7.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 8.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 9.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 1.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 1.5×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 2.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 3.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 4.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 5.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 1.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 1.5×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 2.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞、至少为或约 2.5×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阴性}细胞或更多的时间。

[0399] 在任何所提供方法中的一些方法中,与培养开始时相比,该方法在培养结束时产生了增加数量的g-NK细胞。例如,与培养开始时相比,培养结束时g-NK细胞的增加可大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍、或者大于或大于约800倍。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约1000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约2500倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约3000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约5000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约10000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约15000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约20000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约25000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约30000倍以上。在任何实施方案中的一些实施方案中,增加为或为约35000倍以上。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或温育进行到该方法实现扩增至少为或为约 2.50×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 3.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 4.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 5.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 6.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 7.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 8.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 9.0×10^8 个g-NK细胞、至少为或为约 1.0×10^9 个g-NK细胞、至少为或为约 1.5×10^9 个g-NK细胞、至少为或为约 2.0×10^9 个g-NK细胞、至少为或为约 3.0×10^9 个g-NK细胞、至少为或为约 4.0×10^9 个g-NK细胞、至少为或为约 5.0×10^9 个g-NK细胞或更多、至少为或为约 1.0×10^{10} 个g-NK细胞或更多、至少为或为约 1.5×10^{10} 个g-NK细胞或更多、至少为或为约 2.0×10^{10} 个g-NK细胞或更多、或至少为或为约 2.5×10^{10} 个g-NK细胞或更多的时间。

[0400] 在一些实施方案中,所提供方法导致g-NK细胞的优先扩增。在一些方面,通过区分NK细胞与其他淋巴细胞或免疫细胞以及区分g-NK细胞与常规NK细胞的一种或多种不同标记物的表面表达的存在、不存在或水平来鉴定g-NK细胞。在实施方案中,可通过流式细胞术测定表面表达,例如,通过用特异性结合标记物的抗体染色并检测抗体与标记物的结合。可进行类似的方法来评估胞内标记物的表达,不同的是,此类方法通常包括在染色之前用于固定和透化以通过流式细胞术检测胞内蛋白质的方法。在一些实施方案中,使用甲醛(例如0.01%)实现固定,随后使用洗涤剂(例如0.1%至1%的洗涤剂,例如为或为约0.5%)破坏膜,诸如Triton、NP-50、吐温20、皂苷、洋地黄皂苷或Leucoperm。

[0401] 抗体和其他结合实体可用于检测标记蛋白质的表达水平,以鉴定、检测、富集和/或分离g-NK细胞。合适的抗体可包括多克隆、单克隆、片段(诸如Fab片段)、单链抗体和其他形式的特异性结合分子。

[0402] 在一些实施方案中,如果在细胞上或细胞中存在可检测的存在的标记物(其可以是胞内标记物或表面标记物),则细胞(例如NK细胞亚群)对于具体标记物呈阳性。在实施方案中,如果在基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配的对照进行相同程序所检测到的染色的水平和/或在基本上类似于或在一些情况下高于已知对标记物呈阳性的细胞的水平和/或在高于已知对标记物呈阴性的细胞的水平可检测到染色,则表面表达呈阳性。

[0403] 在一些实施方案中,如果在细胞上或细胞中不存在可检测的存在的标记物(其可以是胞内标记物或表面标记物),则细胞(例如NK细胞亚群)对于具体标记物呈阴性。在实施方案中,如果在基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配的对照进行相同的程序所检测到的染色的水平和/或在基本上低于已知对该标记物呈阳性的细胞的水平和/或在基本上类似于已知对该标记物呈阴性的细胞的水平下不可检测到染色,则表面表达呈阴性。

[0404] 在一些实施方案中,如果与已知对标记物呈阳性的细胞相比,在细胞上或细胞中存在较低水平的可检测的存在的标记物,则细胞(例如NK细胞亚群)对于具体标记物呈低水平(lo或min)。在实施方案中,可通过流式细胞术测定表面表达,例如,通过用特异性结合标记物的抗体染色并检测抗体与标记物的结合,其中如果染色的水平低于已知对标记物呈阳性的细胞,则表面或胞内的表达(取决于所使用的方法)呈低水平。

[0405] 在一些实施方案中,g-NK细胞是具有NK细胞表型的细胞(例如CD45^{阳性}、CD3^{阳性}和/或CD56^{阳性})并且表达鉴定g-NK细胞亚群或与其相关联的一种或多种标记物。

[0406] 在一些实施方案中,如公开的专利申请号US2013/0295044或Zhang等人,2013年,J. Immunol.,第190卷:第1402-1406页中所述,鉴定g-NK细胞。

[0407] 在一些实施方案中,g-NK细胞是不表达大量FcR γ 但表达自然杀伤细胞的至少一种标记物的细胞。FcR γ 链的氨基酸序列(智人(Homo sapiens),也称为高亲和力和免疫球蛋白 γ Fc受体I)可在NCBI数据库中以登录号NP-004097.1(GI:4758344)获得,并在下文以SEQ ID NO:1再现。

[0408] MIPAVLLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLT LLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ(SEQ ID NO:1)

[0409] 在一些实施方案中,可通过观察FcR γ 是否由NK细胞群体或NK细胞亚群表达来检测NK细胞的g-NK细胞亚群。在一些情况下,g-NK细胞被鉴定为不表达FcR γ 的细胞。FcR γ 蛋白是一种胞内蛋白。因此,在一些方面,可在例如通过固定和透化来处理细胞后检测FcR γ 的存在或不存在,以允许检测胞内蛋白。在一些实施方案中,在胞内检测之前,诸如在固定细胞之前,进一步评估细胞的一种或多种表面标记物(CD45、CD3和/或CD56)。在一些实施方案中,g-NK细胞被鉴定、检测、富集和/或分离为CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/FcR γ ^{阳性}的细胞。

[0410] 在一些实施方案中,在扩增群体中大于为或为约50%的NK细胞是FcR γ ^{阳性}。在一些实施方案中,在扩增群体中大于为或为约60%的NK细胞是FcR γ ^{阳性}。在一些实施方案中,在扩增群体中大于为或为约70%的NK细胞是FcR γ ^{阳性}。在一些实施方案中,在扩增群体中大于

为或为约80%的NK细胞是FcR γ ^{阴性}。在一些实施方案中,在扩增群体中大于为或为约90%的NK细胞是FcR γ ^{阴性}。在一些实施方案中,在扩增群体中大于为或为约95%的NK细胞是FcR γ ^{阴性}。例如,本文的方法通常产生了高纯度(例如70%至90%)的g-NK细胞产物。

[0411] 在一些实施方案中,在不采用胞内染色的情况下检测g-NK细胞的表达可能是有用的,诸如例如,如果样本的细胞要进行细胞分选或功能测定。尽管可使用允许FcR γ 的胞内染色的处理(例如固定和透化)来确认基本上纯的细胞群体的身份,但在许多情况下,可采用细胞表面标记物,当鉴定、检测或分离g-NK细胞时,这些细胞表面标记物可在不损伤细胞的情况下进行检测。因此,在一些实施方案中,使用与NK细胞亚群中FcR γ 的缺乏相关的替代标记物谱鉴定g-NK细胞。在一些实施方案中,当取决于细胞的具体应用,难以或不可能评估胞内蛋白(诸如FcR γ)的存在或不存在时,替代标记物谱特别有用。

[0412] 本文发现,细胞表面标记物的某些组合与g-NK细胞表型相关,即细胞缺乏或欠缺FcR γ 的胞内表达,从而提供替代标记物谱以不损伤细胞的方式鉴定或检测g-NK细胞。在一些实施方案中,本文提供的g-NK细胞的替代标记物谱基于一种或多种标记物CD16(CD16^{阳性})、NKG2C(NKG2C^{阳性})或CD57(CD57^{阳性})的阳性表面表达和/或基于一种或多种标记物CD7(CD7^{微弱/阴性})、CD161(CD161^{阴性})和/或NKG2A(NKG2A^{阴性})的低表面表达或阴性表面表达。在一些实施方案中,对细胞进一步评估NK细胞的一种或多种表面标记物,诸如CD45、CD3和/或CD56。在一些实施方案中,可用替代标记物谱CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}来鉴定、检测、富集和/或分离g-NK细胞。在一些实施方案中,用替代标记物谱CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}来鉴定、检测、富集和/或分离g-NK细胞。在一些实施方案中,鉴定、检测、富集和/或分离NKG2C^{阳性}和/或NKG2A^{阴性}的g-NK细胞。

[0413] 在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约50%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约35%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约60%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约45%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约55%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性和/或扩增群体中大于为或为约95%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平。

[0414] 在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约75%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约75%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约85%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于为

或为约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且扩增群体中大于为或为约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0415] 可评估通过所提供方法扩增的细胞的许多功能或表型活性中的任一者,包括但不限于细胞毒性活性、脱颗粒、产生或分泌细胞因子的能力以及一种或多种胞内或表面表型标记物的表达。评估此类活性的方法是已知的,并在本文和工作实施例中举例说明。

[0416] 在一些实施方案中,针对靶细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)细胞毒活性可用作功能性的量度。对于ADCC细胞毒性测定,来自扩增的细胞可在对靶细胞上的靶抗原具有特异性的抗体的存在或不存在下与合适的靶细胞共培养。例如,对于抗骨髓瘤细胞毒作用,可使用许多多发性骨髓瘤(MM)靶细胞中的任一者(例如AM01、KMS11、KMS18、KMS34、LP1或MM.1S),并且用抗CD38(例如达雷妥尤单抗)或抗CD319抗体(例如埃罗妥珠单抗)进行测定。可通过许多方法测定细胞杀伤。例如,细胞可用碘化丙锭(PI)染色,并且NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量可诸如通过流式细胞术分辨。

[0417] 在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约10%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。可通过评估CD107A的表达来测量脱颗粒。例如,在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约20%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约30%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约40%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,在针对肿瘤细胞的抗体的不存在下测量脱颗粒的能力。

[0418] 在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约10%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,诸如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约20%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约30%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于为或为约40%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,在针对肿瘤细胞的抗体的不存在下测量产生干扰素- γ 或TNF- α 的能力。

[0419] 本文提供了通过采用g-NK细胞的替代标记物谱来鉴定或检测含有细胞群体的样本中的g-NK细胞的方法。在一些实施方案中,这些方法包括使细胞样本与结合分子接触,该结合分子诸如对一种或多种标记物CD16、CD57、CD7、CD161、NKG2C和/或NKG2A具有特异性的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,这些方法还包括使细胞样本与结合分子接触,该结合分子诸如对CD45、CD3和/或CD56具有特异性的抗体或抗原结合片段。在这些方法的一些实施方案中,该一种或多种结合分子可同时与样本接触。在这些方法的一些实施方案中,该一种或多种结合分子可依次与样本接触。在一些实施方案中,在接触后,这些方法可包括在保留已与该一种或多种结合分子结合的细胞和/或从样本中分离出未结合的结合分子的条件下一次或多次洗涤。

[0420] 在一些实施方案中,该一种或多种结合分子中的每一者(例如抗体)可直接或间接附着于用于检测对标记物呈阳性或阴性的细胞的标记。例如,结合分子(例如抗体)可与标记缀合、偶联或连接。标记是本领域技术人员熟知的。本文考虑的标记包括但不限于荧光染料、荧光蛋白质、放射性同位素、发色团、金属离子、金颗粒(例如胶体金颗粒)、银颗粒、具有

强光散射性质的颗粒、磁性颗粒(例如磁珠颗粒,诸如Dynabeads[®]磁珠)、多肽(例如FLAG[™]标签、人流感血球凝集素(HA)标签等)、酶诸如过氧化物酶(例如辣根过氧化物酶)或磷酸酶(例如碱性磷酸酶)、链霉亲和素、生物素、发光化合物(例如化学发光底物)、寡核苷酸、特异性结合对的成员(例如配体及其受体)以及本领域熟知的用于当直接或间接附着于所述抗体时显现或检测结合分子(例如抗体)的其他标记。

[0421] 可使用许多用于评估表面标记物或蛋白质的表达水平的熟知方法,诸如通过基于亲和力的方法检测,例如基于免疫亲和力的方法,例如,在表面标记物的上下文中,诸如通过流式细胞术。在一些实施方案中,标记是荧光团,并且用于检测或鉴定g-NK细胞的方法是通过流式细胞术。在一些实施方案中,通过多色流式细胞术将不同标记用于不同标记物中的每一者。

[0422] 在一些实施方案中,这些方法包括使样本与对CD45、CD3、CD56、CD57、CD7和CD161具有特异性的结合分子接触。在一些此类实施方案中,g-NK细胞被鉴定或检测为具有g-NK细胞替代标记物谱CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阴性}的细胞。

[0423] 在一些实施方案中,这些方法包括使样本与对CD45、CD3、CD56、NKG2A和CD161具有特异性的结合分子接触。在一些此类实施方案中,g-NK细胞被鉴定或检测为具有g-NK细胞替代标记物谱CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阳性}/CD161^{阴性}的细胞。

[0424] 在一些实施方案中,所提供方法还可包括分离或富集g-NK,诸如根据任何所提供方法优先扩增的g-NK细胞。在一些此类实施方案中,可获得基本上纯的g-NK细胞群体,诸如含有大于或大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多g-NK细胞的细胞群体,诸如使用所述组中的任一者或标记物的组合测定。抗体和其他结合分子可用于检测标记蛋白质的表达水平的存在或不存在,以用于分离或富集g-NK细胞。在一些实施方案中,通过荧光激活细胞分选(FAC)进行分离或富集。在此类方法的示例中,g-NK细胞通过流式细胞术使用上述用于针对多种细胞表面标记物对细胞进行染色的方法来鉴定或检测,并且染色的细胞被携带在流体流中以用于收集对于与g-NK细胞相关联的标记物呈阳性或阴性的细胞。

[0425] IV. 试剂盒和制品

[0426] 本文提供了包含所提供组合物的制品和试剂盒,这些组合物含有针对特定亚群(诸如g-NK细胞)富集的NK细胞。在一些实施方案中,通过任何所提供方法产生组合物。在一些实施方案中,试剂盒包含所提供组合物和将该组合物作为单一疗法施用的说明书中的任一者。在一些实施方案中,本文提供了包含所提供组合物和附加药剂中的任一者的试剂盒。在一些实施方案中,附加药剂是抗体。在一些实施方案中,附加药剂是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在这些实施方案中的一些实施方案中,附加药剂是全长抗体。示例性抗体包括所述的任何抗体。

[0427] 试剂盒可任选地包括一种或多种组分,诸如使用说明书、装置和附加试剂(例如,用于稀释组合物和/或重建冻干蛋白质的无菌水或盐水溶液),以及用于实施这些方法的组分,诸如管、容器和注射器。在一些实施方案中,试剂盒还可包括用于收集样本、制备和处理样本的试剂,和/或用于定量样本中一种或多种表面标记物的量的试剂,诸如但不限于检测试剂,诸如抗体、缓冲液、用于酶染色的底物、发色团或其他材料,诸如载玻片、容器、微量滴定板,以及任选地用于实施这些方法的说明书。本领域技术人员将认识到可根据所提供方

法使用的许多其他可能的容器和板以及试剂。

[0428] 在一些实施方案中,试剂盒可作为制品提供,这些制品包括用于包装细胞、抗体或试剂或它们的组合物或一种或多种其他组分的包装材料。例如,试剂盒可包括容器、瓶、管、小瓶和适于分离或组织试剂盒组分的任何包装材料。该一个或多个容器可由多种材料诸如玻璃或塑料形成。在一些实施方案中,该一个或多个容器容纳包含细胞或抗体或用于这些方法的其他试剂的组合物。本文的制品或试剂盒可包括在分开的容器中或同一容器中的细胞、抗体或试剂。

[0429] 在一些实施方案中,容纳组合物的该一个或多个容器可以是一次性小瓶或多次用小瓶,在一些情况下,这可允许组合物的重复使用。在一些实施方案中,制品或试剂盒还可包括含有合适稀释剂的第二容器。制品或试剂盒还可包括从商业、治疗和使用观点所期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器、治疗剂和/或具有使用说明书的包装说明书。

[0430] 在一些实施方案中,试剂盒可任选地包括说明书。说明书通常包括描述细胞组合物、试剂和/或抗体以及任选地包括在试剂盒中的其他组分的有形表达,以及使用这些的方法。在一些实施方案中,说明书指示使用细胞组合物和抗体施用给受试者以治疗疾病或病症的方法,诸如根据任何所提供的实施方案。在一些实施方案中,说明书作为标记或包装说明书提供,其在容器上或与容器相关联。在一些实施方案中,说明书可指示组合物的重构和/或使用的指导。

[0431] V. 示例性的实施例

[0432] 所提供的实施方案包括:

[0433] 1. 一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用。

[0434] 2. 根据实施方案1所述的方法,其中所述方法是没有组合施用用于治疗所述多发性骨髓瘤的外源性抗体的单一疗法。

[0435] 3. 根据实施方案1所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用针对多发性骨髓瘤抗原的抗体。

[0436] 4. 根据实施方案3所述的方法,其中所述多发性骨髓瘤抗原包含选自CD38、SLAMF7和BCMA的抗原。

[0437] 5. 根据实施方案3或4所述的方法,其中所述抗体是全长抗体。

[0438] 6. 根据实施方案3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗SLAMF7抗体。

[0439] 7. 根据实施方案3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗BCMA抗体。

[0440] 8. 根据实施方案3至5中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD38抗体。

[0441] 9. 根据实施方案3所述的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。

[0442] 10. 根据实施方案9所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16以及选自BCMA、SLAMF7和CD38的第二多发性骨髓瘤抗原。

[0443] 11. 根据实施方案9或10所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16和CD38。

[0444] 12. 根据实施方案3至11中任一项所述的方法,其中所述抗体每四周施用一次、每三周施用一次、每两周施用一次、每周施用一次或每周两次。

- [0445] 13. 根据实施方案8所述的方法, 其中在施用一个剂量的所述g-NK细胞组合物之前, 已经向所述受试者施用了至少一个剂量的抗CD38抗体。
- [0446] 14. 一种治疗多发性骨髓瘤的方法, 所述方法包括向患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物, 其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用, 并且其中所述受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD38抗体的施用。
- [0447] 15. 根据实施方案1至14中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞组合物在14天周期中以两个剂量施用, 其中所述14天周期重复一至三次。
- [0448] 16. 根据实施方案1至15中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞组合物作为六个总剂量施用。
- [0449] 17. 根据实施方案8和13至16中任一项所述的方法, 其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗。
- [0450] 18. 根据实施方案13至17中任一项所述的方法, 其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的一个月开始。
- [0451] 19. 根据实施方案13至17中任一项所述的方法, 其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的三周内开始。
- [0452] 20. 根据实施方案13至17中任一项所述的方法, 其中所述至少一个剂量的所述抗CD38抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的两周内开始。
- [0453] 21. 根据实施方案8和13至20中任一项所述的方法, 其中所述抗CD38抗体是静脉内施用。
- [0454] 22. 根据实施方案8和13至21中任一项所述的方法, 其中所述抗CD38抗体以每周一次剂量施用, 任选地持续一个或两个28天周期。
- [0455] 23. 根据实施方案8和13至22中任一项所述的方法, 其中每个剂量的所述抗CD38抗体(例如, 达雷妥尤单抗)以为或为约8mg/kg至约32mg/kg的量施用, 任选地为或为约16mg/kg。
- [0456] 24. 根据实施方案8和13至20中任一项所述的方法, 其中所述抗CD38抗体是皮下施用。
- [0457] 25. 根据实施方案8、13至20和24中任一项所述的方法, 其中所述抗CD38抗体(例如, 达雷妥尤单抗)以包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物施用, 任选地其中所述抗CD38抗体组合物包括达雷妥尤单抗和重组人透明质酸酶PH20(例如, 透明质酸酶-fihj)。
- [0458] 26. 根据实施方案25所述的方法, 其中所述抗CD38抗体组合物以每周一次剂量施用, 任选地持续一个或两个28天周期。
- [0459] 27. 根据实施方案25或实施方案26所述的方法, 其中每个剂量的所述抗CD38抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD38抗体(例如, 达雷妥尤单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶(例如, 透明酯酸酶-fihj)。
- [0460] 28. 根据实施方案24至28中任一项所述的方法, 其中每个剂量的所述抗CD38抗体组合物包括约1800mg抗CD38抗体(例如, 达雷妥尤单抗)和约30,000U透明酯酸酶(例如, 透明酯酸酶-fihj)。
- [0461] 29. 根据实施方案8和13至28中任一项所述的方法, 其中所述方法包括每周一次施

用所述抗CD38抗体、任选地所述抗CD38抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用所述g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的所述组合物之前施用一个剂量或两个剂量的所述抗CD38抗体。

[0462] 30. 根据实施方案1至29中任一项所述的方法,其中所述多发性骨髓瘤是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0463] 31. 根据实施方案1至30中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞具有低CD38表达或没有所述表达,任选地其中所述g-NK细胞组合物中少于25%的所述细胞对表面CD38呈阳性。

[0464] 32. 根据实施方案1至31中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物中的所述细胞未被工程化以减少或消除CD38表达。

[0465] 33. 根据实施方案1至32中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物表现出最小的抗CD38诱导的同种相杀,任选地其中所述g-NK细胞组合物中少于10%的细胞表现出抗CD38诱导的同种相杀。

[0466] 34. 一种治疗淋巴瘤的方法,所述方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用。

[0467] 35. 根据实施方案34所述的方法,其中所述方法是没有组合施用用于治疗所述淋巴瘤的外源性抗体的单一疗法。

[0468] 36. 根据实施方案34所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用针对淋巴瘤抗原的抗体。

[0469] 37. 根据实施方案36所述的方法,其中所述淋巴瘤抗原包含选自CD19、CD20和CD30的抗原。

[0470] 38. 根据实施方案36或37所述的方法,其中所述抗体是全长抗体。

[0471] 39. 根据实施方案36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD19抗体。

[0472] 40. 根据实施方案36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD30抗体。

[0473] 41. 根据实施方案36至38中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD20抗体。

[0474] 42. 根据实施方案36所述的方法,其中所述抗体是双特异性抗体。

[0475] 43. 根据实施方案42所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16以及选自CD19、CD20和CD30的第二抗原。

[0476] 44. 根据实施方案43所述的方法,其中所述双特异性抗体针对CD16和CD20。

[0477] 45. 根据实施方案36至45所述的方法,其中所述抗体每四周施用一次、每三周施用一次、每两周施用一次、每周施用一次或每周两次。

[0478] 46. 根据实施方案41所述的方法,其中在施用一个剂量的所述g-NK细胞组合物之前,已经向所述受试者施用了至少一个剂量的抗CD20抗体。

[0479] 47. 一种治疗淋巴瘤的方法,所述方法包括向患有淋巴瘤的受试者施用FcR γ 链表达缺陷的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)组合物,其中所述g-NK细胞组合物每周一次以预先确定的剂量数施用,并且其中所述受试者在之前已经接受了至少一个剂量的抗CD20抗体的施用。

[0480] 48. 根据实施方案34至47中任一项所述的方法,其中所述淋巴瘤是非霍奇金淋巴

瘤(NHL)。

[0481] 49.根据实施方案34至48中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物在14天周期中以两个剂量施用,其中所述14天周期重复一至三次。

[0482] 50.根据实施方案34至49中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物作为六个总剂量施用。

[0483] 51.根据实施方案41和45至50中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗。

[0484] 52.根据实施方案41和45至51中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的一个月开始。

[0485] 53.根据实施方案41和45至52中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的三周内开始。

[0486] 54.根据实施方案41和45至53中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的所述抗CD20抗体的施用在施用所述g-NK细胞组合物之前的两周内开始。

[0487] 55.根据实施方案41和45至54中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是静脉内施用。

[0488] 56.根据实施方案41和45至55中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体以每周一次剂量施用,任选地施用4或8个剂量。

[0489] 57.根据实施方案41和45至56中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体以为或为约250mg/m²至500mg/m²的量施用,任选地为或为约375mg/m²。

[0490] 58.根据实施方案41和45至54中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体是皮下施用。

[0491] 59.根据实施方案41、45至54和58中任一项所述的方法,其中所述抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)以包括透明质酸酶的抗CD20抗体组合物施用,任选地其中所述抗CD20抗体组合物包括利妥昔单抗和人重组透明质酸酶PH20。

[0492] 60.根据实施方案59所述的方法,其中所述抗CD20抗体组合物作为每周一次剂量静脉内施用,任选地在每周一次剂量的所述抗CD20抗体后施用4或8个剂量或任选地3或7个剂量。

[0493] 61.根据实施方案59或实施方案60所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括为或为约1200mg至约2400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和为或为约15,000单位(U)至约45,000U透明酯酸酶。

[0494] 62.根据实施方案59至61中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括约1400mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约23,400U透明酯酸酶。

[0495] 63.根据实施方案59至61中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述抗CD20抗体组合物包括约1600mg抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)和约26,800U透明酯酸酶。

[0496] 64.根据实施方案41和45至63中任一项所述的方法,其中所述方法包括每周一次施用所述抗CD20抗体、任选地所述抗CD20抗体组合物,共8个剂量,并且每周一次施用所述g-NK细胞组合物,共6个剂量,其中可在施用包括g-NK细胞的所述组合物之前施用一个剂量或两个剂量的所述抗CD20抗体。

[0497] 65.根据实施方案1至64中任一项所述的方法,其中在所述g-NK细胞组合物中的细

胞中,大于为或为约60%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约70%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约80%的所述细胞是g-NK细胞,大于为或为约90%的所述细胞是g-NK细胞,或者大于为或为约95%的所述细胞是g-NK细胞。

[0498] 66. 根据实施方案1至64中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合中至少为或为约50%的所述细胞是FcR γ -缺陷型(FcR $\gamma^{\text{阴性}}$)NK细胞(g-NK),其中大于为或为约70%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约70%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0499] 67. 根据实施方案65或实施方案66所述的方法,其中(i)大于为或为约80%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约80%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,(ii)大于为或为约90%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约90%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,或者(iii)大于为或为约95%的所述g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于为或为约95%的所述g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0500] 68. 根据实施方案66或实施方案67所述的方法,其中:

[0501] 在对穿孔素呈阳性的所述细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔素平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素平均水平的至少为或为约两倍;并且/或者

[0502] 在对颗粒酶B呈阳性的所述细胞中,通过胞内流式细胞术测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B平均水平为FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少为或为约两倍。

[0503] 69. 根据实施方案1至68中任一项所述的方法,其中任选地通过CD107a表达测量,所述g-NK细胞组合中大于10%的所述细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地其中所述脱颗粒是在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的不存在下测量的。

[0504] 70. 根据实施方案1至69中任一项所述的方法,其中任选地通过CD107a表达测量,在所述g-NK细胞组合中的所述细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的所述细胞表现出脱颗粒。

[0505] 71. 根据实施方案1至70中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合中大于10%的所述细胞还能够产生针对肿瘤靶细胞的干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的不存在下测量的。

[0506] 72. 根据实施方案1至71中任一项所述的方法,其中在所述g-NK细胞组合中的所述细胞中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于为或为约15%、大于为或为约20%、大于为或为约30%、大于为或为约40%、或者大于为或为约50%的所述细胞产生效应细胞因子。

[0507] 73. 根据实施方案72所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

[0508] 74. 根据实施方案72或实施方案73所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

[0509] 75. 根据实施方案1至74中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合已经通过用经辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3-/CD57+细胞的离体扩增产生,其中所述CD3-/CD57+细胞来自供体受试者的生物样本富集。

- [0510] 76. 根据实施方案75所述的方法,其中所述供体受试者是CMV血清阳性的。
- [0511] 77. 根据实施方案75或实施方案76所述的方法,其中所述供体受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样本来自为所述CD16 158V/V NK细胞基因型或所述CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。
- [0512] 78. 根据实施方案75至77中任一项所述的方法,其中来自所述供体受试者的外周血样本中至少为或为约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性),并且所述外周血样本中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低水平(NKG2A阴性)。
- [0513] 79. 根据实施方案75至77中任一项所述的方法,其中所述经辐照的饲养细胞在HLA I类和HLA II类方面存在缺陷。
- [0514] 80. 根据实施方案78至79中任一项所述的方法,其中所述经辐照的饲养细胞是221.AEH细胞。
- [0515] 81. 根据实施方案79至80中任一项所述的方法,其中在两种或更多种重组细胞因子的存在下进行所述培养,其中至少一种重组细胞因子是白细胞介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21。
- [0516] 82. 根据实施方案81所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。
- [0517] 83. 根据实施方案81所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。
- [0518] 84. 根据实施方案1至83中任一项所述的方法,其中所述组合物中的所述g-NK细胞来自单个供体受试者,所述g-NK细胞已经从相同生物样本被扩增。
- [0519] 85. 根据实施方案1至84中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中配制,任选地其中所述冷冻保护剂是DMSO并且所述冷冻保存培养基是5%至10%DMSO(v/v)。
- [0520] 86. 根据实施方案1至85中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞没有用抗原受体工程化,任选地其中所述抗原受体是嵌合抗原受体。
- [0521] 87. 根据实施方案1至86中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞没有用可分泌的细胞因子、任选地细胞因子受体融合蛋白诸如IL-15受体融合蛋白(IL-15RF)工程化
- [0522] 88. 根据实施方案1至87中任一项所述的方法,其中所述方法不包括向所述受试者施用外源性细胞因子以支持NK细胞存活或扩增,其中所述外源性细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。
- [0523] 89. 根据实施方案1至88中任一项所述的方法,每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约为或为约 1×10^8 个细胞至为或为约 50×10^9 个细胞。
- [0524] 90. 根据实施方案1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 5×10^8 个细胞。
- [0525] 91. 根据实施方案1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 5×10^9 个细胞。
- [0526] 92. 根据实施方案1至89中任一项所述的方法,其中每个剂量的g-NK细胞是所述g-NK细胞组合物的为或为约 10×10^9 个细胞。
- [0527] 93. 根据实施方案1至92中任一项所述的方法,其中在所述施用所述剂量的g-NK细胞之前,所述受试者已经接受了淋巴细胞清除疗法。
- [0528] 94. 根据实施方案93所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和/或

环磷酰胺。

[0529] 95. 根据实施方案93或实施方案94所述的方法,其中所述淋巴细胞清除包括以为或为约20mg/m²至40mg/m²受试者体表面积,任选地为或为约30mg/m²,每天所述施用氟达拉滨,持续2至4天,和/或以为或为约200mg/m²至400mg/m²受试者体表面积,任选地为或为约300mg/m²,每天所述施用环磷酰胺,持续2至4天。

[0530] 96. 根据实施方案94或实施方案95所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。

[0531] 97. 根据实施方案1至96中任一项所述的方法,其中所述淋巴细胞清除疗法包括每天以为或为约30mg/m²受试者体表面积所述施用氟达拉滨,以及每天以为或为约300mg/m²受试者体表面积施用环磷酰胺,各自持续2至4天,任选地持续3天。

[0532] 98. 根据实施方案1至97中任一项所述的方法,其中在所述淋巴细胞清除疗法开始后两周内或者为或为约两周时开始施用一定剂量的g-NK细胞。

[0533] 99. 根据实施方案1至97中任一项所述的方法,其中在所述淋巴细胞清除疗法开始后7天内或者为或为约7天时开始施用一定剂量的g-NK细胞。

[0534] 100. 根据实施方案1至99中任一项所述的方法,其中所述个体是人。

[0535] 101. 根据实施方案1至100中任一项所述的方法,其中所述组合物中的所述NK细胞对于所述个体是同种异体的。

[0536] 102. 根据实施方案1至101中任一项所述的方法,所述方法还包括施用外源性细胞因子支持以促进g-NK细胞在所述受试者体内的扩增或持久性,任选地其中所述外源性细胞因子是或包括IL-15。

[0537] VI. 实施例

[0538] 包括以下实施例仅用于说明的目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0539] 实施例1:g-NK细胞在不同细胞因子的存在下的扩增

[0540] 将50mL来自CMV血清阳性供体的新鲜全血(NKG2C^{阳性}和NKG2A^{阴性} NK细胞百分比分别为56.24%和11.68%)收集到ACD真空采血管中,并用PBS1:1稀释。根据制造商的说明书,通过Histopaque[®]密度离心分离PBMC。在收获含PBMC的血沉棕黄层之后,用PBS洗涤PBMC并计数。在进行细胞计数后,进行磁珠分离以增加g-NK细胞的频率。磁珠分离是CD3耗竭,随后是CD57富集,以便分离CD57^{阳性} NK细胞。

[0541] 制备转基因淋巴瘤细胞系221.AEH(Lee等人,1998年,Journal of Immunology,第160卷:第4951-4960页)和转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL(Fujisaki等人,2009年,Cancer Research,第69卷第9期:第4010-4017页)作为用于NK细胞扩增的饲养细胞。饲养细胞取自新鲜培养物(即,而不是冷冻保存的储备液),并在使用前进行辐照。扩增221.AEH和K562-mb15-41BBL细胞,其中接种密度为5×10⁵个细胞/mL,并且传代培养密度为2×10⁵个细胞/mL。用于使221.AEH饲养细胞生长的培养基是具有10%FBS和200μg/mL潮霉素B的RPMI-1640。用于使K562-mb15-41BBL饲养细胞生长的培养基是具有10%FBS的RPMI-1640。

[0542] 在四种不同条件下扩增未冷冻保存的NK细胞:以2:1AEH:NK细胞比例与500IU/mL IL-2;以2:1K562-mb15-41BBL:NK细胞比例与500IU/mL IL-2;以1:1:1AEH:K562-mb15-41BBL:NK细胞比例与500IU/mL IL-2;以及以2:1AEH:NK细胞比例与500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21。在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM

培养基中进行所有扩增。共培养的细胞在37°C和5%CO₂中培养21天。每当更换或补充培养基时(第5天、第7天、第10天、第13天、第16天、第19天和第21天)对细胞进行计数,并且在第0天、第13天和第21天通过流式细胞术评估g-NK的百分比。

[0543] 如图1A至图1B所示,向扩增培养基中添加IL-21导致g-NK细胞扩增的显著增加。对于在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,总g-NK细胞计数也是最高的(图1A)。对于在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,到第21天g-NK细胞的倍数扩增也是最高的(图1B)。

[0544] 总之,这些结果表明IL-21的存在改善了g-NK细胞的扩增。

[0545] 实施例2:在不同细胞因子的存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能

[0546] 在该研究中,在不同饲养细胞和细胞因子的存在下,包括在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞中测量NK细胞效应子功能,如实施例1中所述。使用0.5:1NK:MM细胞比例的靶细胞系LP1和MM.1S并使用抗体达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗如下所述进行测定。

[0547] A. 细胞介导的细胞毒性

[0548] 将扩增的NK细胞解冻后,在1μg/mL达雷妥尤单抗(抗-CD38)或1μg/mL埃罗妥珠单抗(抗-CD319)的存在下,将10⁴个NK细胞与MM靶细胞以1:1NK细胞:MM细胞比例共培养。在37°C下在CO₂培养箱中培养4小时之后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色以定量NK细胞的数量。在最后一次洗涤之后,添加碘化丙锭(PI),并使用4色流式细胞术分辨NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2016年,Clin. Exp. Immunol.,第185卷:第239-251页)。

[0549] 如图2A至图2B所示,在IL-21的存在下扩增21天的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图2A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图2B)的细胞介导的细胞毒性比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞更强。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的细胞介导的细胞毒性。

[0550] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

[0551] B. 脱颗粒

[0552] 将扩增的NK细胞解冻后,在1μg/mL达雷妥尤单抗或1μg/mL埃罗妥珠单抗的存在下,将2.0×10⁵个NK细胞与MM靶细胞以1:1NK细胞:MM细胞比例共培养。对于脱颗粒测定,将2μL的VioGreen缀合的抗CD107a添加到共培养物中,在37°C的CO₂培养箱中培养一小时,之后添加4μL含有莫能菌素的BD GolgiStop。对于细胞因子表达测定,添加6μL含有布雷菲德菌素A的BD GolgiStop。然后将细胞在37°C下在CO₂培养箱中再培养五小时。温育后,收获细胞,洗涤,并用0.5μL的抗CD45抗体、0.5μL的抗CD3抗体和1μL的抗CD56抗体(所有抗体均购自Miltenyi Biotec)染色。然后按照制造商的说明书,使用来自Miltenyi Biotec的内部染色试剂盒固定并透化细胞。然后将细胞用1μL的抗FcRγ、2μL的抗穿孔素、2μL的抗颗粒酶B、2μL的干扰素-γ和2μL的TNF-α抗体染色,如表E1中所述。在最后一次洗涤之后,使用八色流式细胞术分辨细胞。

[0553] 表E1. 用于功能测定的抗体组。

管	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
脱颗粒 (细胞毒性颗粒的释放)								
[0554] 1	CD45	CD107a	FcR γ	穿孔素		CD3	颗粒酶 B	CD56
细胞因子表达								
2	CD45	CD107a	FcR γ	IFN- γ		CD3	TNF- α	CD56

[0555] 如图3A至图3D所示,在扩增的13天(图3A至图3B)和21天(图3C至图3D)之后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图3A和图3C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图3B和图3D)比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞的脱颗粒更多。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的脱颗粒。

[0556] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

[0557] C. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0558] 如图4A至图4D所示,在扩增的13天(图4A至图4B)和21天(图4C至图4D)之后,如通过穿孔素阳性细胞的百分比(图4A和图4C)和总穿孔素表达(MFI)(图4B和图4D)所测量,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔素。此外,在扩增13天和21天之后,如通过颗粒酶B阳性细胞的百分比(图4A和图4C)和总颗粒酶B表达(MFI)(图4B和图4D)所测量,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B。

[0559] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的穿孔素和颗粒酶B的表达。

[0560] D. 干扰素- γ 的表达

[0561] 如图5A至图5D所示,在扩增的13天(图5A至图5B)和21天(图5C至图5D)之后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图5A和图5C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图5B和图5D)比在没有IL-21的情况下表达更多的干扰素- γ 。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的干扰素- γ 的表达。

[0562] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 的表达。

[0563] E. TNF- α 的表达

[0564] 如图6A至图6D所示,在扩增的13天(图6A至图6B)和21天(图6C至图6D)之后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图6A和图6C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图6B和图6D)比在没有IL-21的情况下表达更多的TNF- α 。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的TNF- α 的表达。

[0565] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 的表达。

[0566] 实施例3:g-NK细胞在附加细胞因子的存在下的扩增

[0567] 在另一个研究中,比较了在细胞因子混合物和浓度的各种组合的存在下扩增的NK

细胞的扩增速率。从与实施例1中相同的供体以及如上所述收获NK细胞。以 2×10^5 个细胞/mL的密度和传代培养密度接种NK细胞,并将它们与经辐照的221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH:NK细胞比例共培养。对于NK细胞扩增,添加以下浓度的细胞因子:100IU/mL(低IL-2)或500IU/mL(IL-2)的IL-2;10ng/mL的IL-15;25ng/mL的IL-21;10ng/mL的IL-12;10ng/mL的IL-18;和/或10ng/mL的IL-27。在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM培养基中进行所有扩增。

[0568] 如图7所示,在IL-21的存在下扩增的NK细胞具有比在IL-2和IL-15, IL-12、IL-15和IL-18,以及IL-15、IL-18和IL-27自身的存在下扩增的NK细胞更高的g-NK细胞扩增速率。在IL-15的存在或不存在下,导致最高g-NK细胞扩增速率的细胞因子的组合是IL-2和IL-21。

[0569] 总之,这些结果表明IL-21的存在比其他细胞因子混合物更多地改善了g-NK细胞的扩增速率。

[0570] 实施例4:在附加细胞因子的存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能

[0571] 在细胞因子的存在下,包括在IL-21的存在下,在扩增15天的g-NK细胞中测量NK细胞效应子功能,如实施例3中所述。使用0.5:1NK:MM细胞比例的靶细胞系LP1和MM.1S并使用抗体达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗如实施例2中所述进行测定。

[0572] A. 细胞介导的细胞毒性

[0573] 如图8A和图8B所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图8A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图8B)比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞具有更大的细胞介导的细胞毒性。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有更大的细胞介导的细胞毒性。

[0574] 总之,这些结果表明,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

[0575] B. 脱颗粒

[0576] 如图8C和图8D所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图8C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图8D)比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞的脱颗粒更多。对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,在所有条件下,包括在抗体的不存在下,观察到更大的脱颗粒。

[0577] 总之,这些结果表明,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

[0578] C. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0579] 如图8E和图8F所示,如通过穿孔素阳性细胞的百分比(图8E)和总穿孔素表达(MFI)(图8F)所测量,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞比表达更多的溶细胞蛋白穿孔素。此外,如通过颗粒酶B阳性细胞的百分比(图8E)和总颗粒酶B表达(MFI)(图8F)所测量,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B。向扩增培养基中添加IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27增强了g-NK细胞的颗粒酶B的表达。

[0580] 总之,这些结果表明,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、

IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的穿孔素和颗粒酶B的表达。

[0581] D. 干扰素- γ 的表达

[0582] 如图8G至图8H所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图8G)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图8H)比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多的干扰素- γ 。对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,在所有条件下,包括在抗体的不存在下,观察到更大的干扰素- γ 的表达。向扩增培养基中添加IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21增强了g-NK细胞在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)的干扰素- γ 的表达。向扩增培养基中添加IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27增强了g-NK细胞在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)的干扰素- γ 的表达。

[0583] 总之,这些结果表明,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 的表达。

[0584] E. TNF- α 的表达

[0585] 如图8I至图8J所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图8I)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图8J)比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多的TNF- α 。对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,在所有条件下,包括在抗体的不存在下,观察到更大的TNF- α 的表达。向扩增培养基中添加IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27增强了g-NK细胞在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)的抗体诱导的TNF- α 的表达。

[0586] 总之,这些结果表明,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 的表达。

[0587] 实施例5:在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的扩增和细胞效应子功能

[0588] 在该研究中,将在IL-21的存在下扩增的NK细胞的扩增速率和NK细胞效应子功能与在IL-21的不存在下扩增的NK细胞的扩增速率和NK细胞效应子功能进行比较。按照制造商的说明书,通过Histopaque[®]密度离心从来自CMV阳性的人供体或用于比较的CMV血清阴性的供体的全血中分离人外周血单核细胞(PBMC)。供体是CMV血清阳性的(n=8)和CMV血清阴性的(n=6)(年龄37.8 \pm 10.6岁;8名男性和6名女性)。

[0589] 从血沉棕黄层收获PBMC,洗涤,并通过流式细胞术评估存活的CD45^{阳性}细胞。通过使用Miltenyi MACS[™]微珠的基于免疫亲和力的磁珠分离来富集NK细胞,即通过耗竭CD3^{阳性}细胞以去除T细胞(CD3耗竭,CD3^{阳性})或通过耗竭CD3随后对CD57进行阳性选择以富集CD57^{阳性}NK细胞(CD3^{阴性}CD57^{阳性})。扩增前最初富集CD3^{阴性}/CD57^{阳性}细胞的后一种方法用于随后的扩增g-NK细胞的实验中。作为进一步的比较,通过CD3耗竭,随后对CD16进行阳性选择来富集NK细胞(富集CD16^{阳性}NK细胞和单核细胞(CD3阴性CD57阳性))。以2 \times 10⁵个细胞/mL的密度接种NK细胞,并且以2 \times 10⁵个细胞/mL的传代培养密度接种NK细胞。将NK细胞与 γ 辐照的(100Gy)221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH:NK细胞比例共培养,并在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL),或单独的IL-2(500IU/mL)的存在下扩增。如果PBMC在富集NK细胞前已被冷冻保存,则使用1:1经辐照的221.AEH饲养细胞:NK细胞的比例,如实施例6中进一步描述的。在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM培养基中进行所有扩增。将NK细胞扩增2周,并且每2至5天更换培养基。使用90%FBS和10%DMSO将扩增的NK细胞冷冻保存,以用于随后的功能测定。

[0590] 在扩增14天之后评估扩增和细胞效应子功能。使用0.5:1NK:MM细胞比例的靶细胞系LP1和MM.1S并使用抗体达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗如实施例2中所述进行测定。

[0591] 在随后的实施例中描述的一些研究中,将g-NK细胞的表型和功能活性与cNK细胞进行比较。由于来自CMV血清阴性的供体的cNK细胞的产率不足以及使用上述方法来自CMV血清阳性的供体的g-NK细胞的优先扩增(结果在下文第A章节中描述),因此使用另选方法扩增cNK细胞以用于体外功能和体内研究。该扩增方法使用K652-mbIL15-41BBL饲养细胞和500IU/mL IL-2在2周内将cNK细胞扩增 180 ± 89 倍($n=5$ CMV^{阴性}) (Fujisaki等人,2009年,Cancer Res.,第68卷第9期:第4010-4017页)。在5个CMV阴性供体(年龄 38.9 ± 9.8 岁;3名男性和2名女性)中,g-NK细胞的比例在扩增之前为 $1.5 \pm 0.5\%$,并且在扩增之后为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。

[0592] A. g-NK细胞的扩增速率

[0593] 在培养基更换时对细胞进行计数,并在第0天和第14天通过流式细胞术评估g-NK细胞的百分比。如图9A和图9B所示,在扩增前最初富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}细胞然后在IL-21的存在下扩增的NK细胞比类似条件但没有IL-21的情况下具有更高的g-NK细胞的扩增速率。如使用FcR γ 的胞内染色和流式细胞术测量的,当测量g-NK细胞的百分比(图9A)和计数(图9B)两者时,观察到更高的g-NK细胞的扩增速率。

[0594] 在扩增前,CMV血清阳性的供体中g-NK细胞的比例为 $30.8 \pm 3.1\%$ (总NK细胞的%),而CMV血清阴性的供体中g-NK细胞的比例仅为 $1.8 \pm 0.3\%$ (总NK细胞的%)。在最初富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}细胞之后扩增后,对于CMV血清阳性的供体,g-NK细胞的比例增加至 $84.0 \pm 1.4\%$,但对于CMV血清阴性的供体没有变化($1.5 \pm 0.4\%$) (图9C)。描述g-NK细胞在CMV血清阳性和血清阴性的供体中的比例的代表性流式细胞术点图和柱状图示于图9E和图9F中。g-NK亚群中NKG2C阳性/NKG2A阴性NK细胞的百分比范围为1.7%至51% ($26.8 \pm 13.9\%$)。因此,在g-NK和NKG2C^{阳性}/NKG2A^{阴性}NK细胞之间存在表型重叠,但它们不相同。

[0595] g-NK细胞的代表性扩增示于图9D中,其中示出扩增方法增加了来自具有可检测g-NK群体的CMV血清阳性的供体的g-NK细胞的比例,其中总NK细胞数量增加了至少400倍。

[0596] 总之,这些结果表明IL-21的存在改善了g-NK细胞的扩增。

[0597] B. 细胞介导的细胞毒性

[0598] 如图9G和图9H所示,在IL-21的存在下扩增的NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图9G)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图9H)比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞具有更大的细胞介导的细胞毒性。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的细胞介导的细胞毒性。

[0599] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

[0600] C. 脱颗粒

[0601] 如图9I和图9J所示,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图9I)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图9J)比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞的脱颗粒更多。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的脱颗粒。

[0602] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增

的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

[0603] D. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0604] 如图9K和图9L所示,如通过总穿孔素表达(GMFI)所测量(图9L),而不是穿孔素阳性细胞的百分比所测量(图9K),在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔素。此外,如通过颗粒酶B阳性细胞的百分比(图9K)和总颗粒酶B表达(GMFI)(图9L)所测量,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B。

[0605] 在扩增的g-NK细胞中穿孔素(图9M,左)和颗粒酶B(图9M,右)的基线表达也显著高于cNK细胞(n=5)。NK和cNK细胞的穿孔素和颗粒酶B的表达的代表性柱状图示于图9N中。

[0606] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有针对肿瘤细胞的增强的穿孔素和颗粒酶B的表达。

[0607] E. 干扰素- γ 的表达

[0608] 如图9O和图9P所示,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图9O)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图9P)比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的干扰素- γ 。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的干扰素- γ 的表达。

[0609] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 的表达。

[0610] F. TNF- α 的表达

[0611] 如图9Q和图9R所示,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图9Q)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图9R)比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的TNF- α 。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下,观察到IL-21扩增的g-NK细胞具有更大的TNF- α 的表达。

[0612] 总之,这些结果表明,与没有IL-21时扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 的表达。

[0613] G. g-NK供体中效应子功能的比较

[0614] 如所述扩增g-NK细胞和cNK细胞,并在不同供体之间比较效应子活性。使用0.5:1NK:MM细胞比例的靶细胞系MM.1S并使用抗体达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗如实施例2中所述进行测定。在共培养之后,将细胞固定并透化,并通过胞内细胞因子染色分析干扰素- γ (IFN γ)和TNF- α (TNF α)。图9S(IFN γ)和图9T(TNF α)中描述的结果表明,g-NK供体之间的供体变异性低,其中mAb-依赖性IFN γ 和TNF α 应答的标准误差小于5。对于其他效应子功能也观察到类似结果。结果表明,所有g-NK供体的效应子功能优于所有测试的cNK供体。

[0615] 实施例6:g-NK细胞在IL-21/抗IL-21复合物的存在下的扩增

[0616] 将冷冻保存的PBMC解冻并经由磁分选富集CD3^{阴性}CD57^{阳性}NK细胞。在扩增这些NK细胞前,通过将IL-21和抗IL-21抗体组合来形成IL-21/抗IL-21复合物。将IL-21和抗IL-21抗体在37°C下以及浓度分别为25ng/mL和250ng/mL下共温育30分钟。然后将复合物与500IU/mL IL-2和10ng/mL IL-15一起添加到NK细胞扩增培养基中。将NK细胞与经辐照的221.AEH饲养细胞以1:1NK:221.AEH饲养细胞比例共培养。为了比较,还在浓度分别为500IU/mL、10ng/mL和25ng/mL的IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增NK细胞。

[0617] 如图10所示,在IL-2、IL-15和IL-21/抗IL-21复合物的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有更高的扩增速率。

[0618] 实施例7:在冷冻保存之后g-NK细胞效应子功能的维持

[0619] 将先前冷冻保存的g-NK细胞的NK细胞效应子功能与新鲜富集的(即,未冷冻保存的)g-NK细胞的NK细胞效应子功能进行比较(n=4)。将富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}的NK细胞与经辐照的221.AEH饲养细胞以2:1221.AEH:NK细胞比例且在500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21的存在下共培养。在扩增之后,对NK细胞进行新鲜功能评估,或将其冷冻保存在含有10%DMSO的90%FBS中,并且浓度为每1.8ml冷冻保存培养基2000万个细胞。在没有抗体以及1 μ g/mL达雷妥尤单抗或1 μ g/mL埃罗妥珠单抗的存在下评估针对LP1和MM.1S细胞系的NK细胞效应子功能。

[0620] A. 脱颗粒

[0621] 如图11A和图11B所示,先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图11A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图11B)具有相当的脱颗粒水平。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到相当的脱颗粒水平。

[0622] 总之,这些结果表明,在冷冻保存之后维持了响应于多发性骨髓瘤靶细胞的g-NK细胞脱颗粒。

[0623] B. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0624] 如图11C和图11D所示,先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜g-NK细胞具有相当的穿孔素(图11C)和颗粒酶B表达(图11D)。总之,这些结果表明,g-NK细胞穿孔素和颗粒酶B的表达在冷冻保存之后得以维持。

[0625] C. 干扰素- γ 的表达

[0626] 如图11E和图11F所示,先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图11E)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图11F)具有相当的干扰素- γ 的表达水平。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到相当的干扰素- γ 的表达。

[0627] 总之,这些结果表明,在冷冻保存之后维持了响应于多发性骨髓瘤靶细胞的g-NK细胞干扰素- γ 的表达。

[0628] D. TNF- α 表达

[0629] 如图11G和图11H所示,先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜g-NK细胞针对CD38^高MM细胞系LP1(图11G)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图11H)比具有降低的TNF- α 表达水平。在抗体的不存在以及达雷妥尤单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到降低的TNF- α 表达。

[0630] 总之,这些结果表明,在冷冻保存之后降低了响应于多发性骨髓瘤靶细胞的g-NK细胞TNF- α 表达。

[0631] 实施例8:与cNK细胞相比,对体内g-NK细胞的持久性的评估

[0632] 将基本上如实施例5所述扩增的NK细胞注射到小鼠中,并使用流式细胞术对生物样本进行分析以评估它们的持久性。

[0633] 如实施例5中所述,在最初从冷冻保存的PBMC富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}细胞之后扩增g-NK细胞,随后在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL)刺激性细胞因子的存在下,以1:1 221.AEH:NK细胞比例用经辐照的221.AEH饲养细胞扩增。由于来自CMV血清阴性的供体的cNK细胞的产率不足,因此使用实施例5中描述的另选方法来扩增cNK细胞。使用

转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL和IL-2将cNK细胞扩增2周。从冷冻保存的PBMC和冷冻保存的饲养细胞中扩增所有细胞。冷冻保存的细胞的冷冻培养基是CS-10 (Biolife Solutions, Bothell, WA, USA)。冷冻保存的细胞产物在施用给小鼠前在热水浴中快速解冻(37°C)。

[0634] 将单剂量的 1×10^7 个扩增的NK细胞(新鲜g-NK、冷冻保存的g-NK或冷冻保存的cNK细胞)经由尾静脉静脉内注射到雌性NOD.Cg-PrkD^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠(n=9,每组3只)中。为了提供NK细胞支持,每三天经由I.P.途径施用约2 μ g/小鼠人重组IL-15(参见表2)。将在输注后第6天、第16天、第26天和第31天收集的血液立即通过流式细胞术分析。在第31天处死小鼠,并收集骨髓和脾用于立即进行流式细胞术分析。

[0635] 表2:持久性研究设计

组号	臂	小鼠数量	NK 给药日	采血天数	
[0636]	1	IL-15+新鲜第 14 天 g-NK	3	1	6、16、26、31 (处死)
	2	IL-15+冷冻保存第 14 天 g-NK	3	1	6、16、26、31 (处死)
	3	IL-15+冷冻保存第 14 天 cNK	3	1	6、16、26、31 (处死)

[0637] 图12A至图C示出相对于外周血(图12A)、脾(图12B)和骨髓(图12C)中的cNK细胞,新鲜和冷冻保存的g-NK细胞的持久性增强。在多个时间点($p < 0.001$) (图12A)以及第31天处死时($p < 0.001$)的脾($p < 0.001$) (图12B)和骨髓($p < 0.05$) (图12C)中,冷冻保存的g-NK细胞的持久性比冷冻保存的cNK细胞在外周血中所观察到的持久性高90%。图12A还示出新鲜和冷冻保存的g-NK细胞的水平持续在可比较的水平直至该研究的至少第26天。

[0638] 结果与观察到g-NK细胞表现出显著改善的持久性一致。这些结果证明,新鲜或冷冻保存的g-NK作为增强mAb ADCC的可行的现成细胞疗法的效用。

[0639] 实施例9:评估CD38和SLAMF7对g-NK细胞的影响和g-NK细胞的同种相杀活性

[0640] 本实施例部分地证明,由于缺乏靶表面标记物而保护g-NK细胞免受抗体的影响。

[0641] g-NK细胞基本上通过实施例5中描述的方法扩增,除了某些例外:1) 22.AEH靶细胞与NK细胞的比例为2.5:1(与实施例5中的2:1比例相比),2) NK细胞暴露于较低水平的IL-2(与实施例5中的500IU/ml相比为100IU/ml),并且3)在扩增期间不存在IL-21。将大约 2.0×10^5 个NK细胞和/或MM.1S或Raji细胞等分到流动管中并用2 μ L的7-AAD生存力染料和2 μ L的抗CD45、2 μ L的抗CD20、2 μ L的抗CD38、2 μ L的抗CD3、10 μ L的抗SLAMF7和2 μ L的抗CD56抗体染色,如表E3中所述。在4°C下温育10分钟之后,洗涤细胞并使用抗FceRI抗体(Millipore)进行胞内染色。在染色过程完成之后,通过8色流式细胞术(Miltenyi MACSQuant Analyzer 10)评估表达g-NK、cNK和MM.1S或Raji细胞的CD20、CD38和SLAMF7的百分比。

[0642] 表E3.流式细胞术组测定CD20、CD38和SLAMF7在NK、MM和Raji细胞上的表达。

条件	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
仅 NK	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅 NK CD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅 NK CD38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅 NK SLAMF7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3		CD56
NK+MM	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK+MM CD38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK+MM SLAMF7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3		CD56
[0643] 仅 MM	CD45	CD20		CD38	7-AAD		SLAMF7	
仅 MM CD38 FMO	CD45	CD20			7-AAD		SLAMF7	
仅 MM SLAMF7 FMO	CD45	CD20		CD38	7-AAD			
NK+Raji	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK+Raji CD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅 Raji	CD45	CD20			7-AAD			
仅 Raji CD20 FMO	CD45				7-AAD			

[0644] *FcRg是胞内表位

[0645] CD20、CD38和SLAMF7在g-NK、cNK和MM.1S细胞上的表达示于图13A至图13D中。g-NK和cNK两者均缺乏在Raji淋巴瘤细胞上高度表达的CD20的表达(图13A)。g-NK对CD38的表达远低于cNK和MM.1S细胞(参见图13B;两者 $p < 0.001$)。SLAMF7的表达在g-NK和cNK之间没有差异($p = 0.9$)，但是g-NK和cNK两者均表现出比MM.1S细胞低得多的SLAMF7的表达(参见图13C;两者 $p < 0.001$)。当与扩增的cNK比较时，在扩增的g-NK上也观察到CD38^{阳性}NK细胞的减少的百分比(参见图13D, $p < 0.001$)。此外，相对于CD38阳性cNK和MM1/S细胞，CD38阳性g-NK细胞上的CD38表达(MFI)强度降低(图13E, $p < 0.001$)。描述g-NK细胞相对于cNK和MM.1S细胞的减少的CD38表达的代表性柱状图示于图13F中。

[0646] g-NK对CD20、CD38或SLAMF7表达的缺乏提供了利妥昔单抗(抗CD20)、达雷妥尤单抗(抗CD38)或埃罗妥珠单抗(抗SLAMF7)对mAb诱导的同种相杀的保护作用。总之，该资料进一步说明，当与cNK相比时，特别是当在治疗性抗体诸如达雷妥尤单抗的存在下，g-NK如何具有持久性优点。

[0647] 在IL-21的存在下通过实施例5中所述的扩增方法观察到类似的结果，这表明在有或没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞之间在CD38或SLAMF7表达上没有差异。在进一步的评估中，将扩增的g-NK细胞的同种相杀速率与扩增的cNK细胞的同种相杀速率进行比较。如图13B和图13D至图13F所示，g-NK细胞上的CD38表达显著低于cNK细胞，并且如图13C所示，g-NK和cNK细胞上存在同样低水平的SLAMF7。这些结果表明，g-NK细胞针对这些靶标缺乏同种相杀作用的潜力，因为如果NK细胞表达mAb靶标，则ADCC活性可导致除肿瘤之外的NK细胞还通过同种相杀消除。cNK细胞表达高水平的CD38的发现与以前的结果一致，这表明在患者中 $>90\%$ 的CD38^高NK细胞在达雷妥尤单抗治疗之后迅速耗竭(Casneuf等人，2017年，Blood Adv, 第1卷第23期:第2105-2114页)。

[0648] 使用基本上如实施例5所述的方法，使用六(6)个独特供体来产生扩增的g-NK(6个CMV⁺, 3男3女, 年龄 39 ± 7 岁)，并且使用8个独特供体来扩增cNK(8个CMV⁻, 4男4女, 年龄 38 ± 9 岁)。g-NK的比例对于g-NK供体为 $85 \pm 4\%$ ，并且对于cNK供体为 $2 \pm 1\%$ 。

[0649] 为了评估同种相杀,在1 μ g/mL达雷妥尤单抗(抗CD38)的存在下培养约 1×10^4 个扩增的NK细胞(g-NK或cNK)。在37 $^{\circ}$ C下在5%CO $_2$ 培养箱中培养4小时之后,洗涤细胞并用抗CD3和抗CD56抗体染色以定量NK细胞的数量。在最后一次洗涤之后,添加碘化丙锭(PI),并使用3色流式细胞术分辨活NK细胞和死NK细胞的数量(Bigley等人,2016年,Clin.Exp.Immunol.,第185卷:第239-251页)。如图13G所示,g-NK细胞具有比cNK低至1/13的同种相杀。用埃罗妥珠单抗进行的类似实验表明,用埃罗妥珠单抗处理的g-NK或cNK没有检测到同种相杀。

[0650] 与在IL-21的不存在下扩增的g-NK细胞的结果一起,这些结果与g-NK细胞在MM中赋予增强的mAb抗肿瘤活性的能力一致,而不遭受与同种相杀相关的耗竭。

[0651] 实施例10:在多发性骨髓瘤的弥散性原位异种移植MM.1S模型中的体内功效

[0652] 通过在多发性骨髓瘤的鼠模型中测量肿瘤抑制和存活来评估NK细胞(扩增的g-NK细胞或cNK细胞)与达雷妥尤单抗组合的体内功效。在最初从冷冻保存的PBMC富集CD3^{阳性}/CD57^{阳性}细胞之后如实施例5中所述扩增g-NK细胞,随后在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL)刺激性细胞因子的存在下,以1:1 221.AEH:NK细胞比例用经辐照的221.AEH饲养细胞扩增。由于来自CMV血清阴性的供体的cNK细胞的产率不足,因此使用实施例5中描述的另选方法来扩增cNK细胞。使用转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL和IL-2将cNK细胞扩增2周。从冷冻保存的PBMC和冷冻保存的饲养细胞中扩增所有细胞。

[0653] 将大约 5×10^5 个萤光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞静脉内注射到雌性NSG小鼠的尾静脉中,并使其生长14天。经由I.P.途径施用单克隆抗体达雷妥尤单抗,并每周静脉内施用 6.0×10^6 个扩增的g-NK或cNK细胞,持续5周。在给肿瘤施用之后两周开始,每三天经由I.P.途径施用2 μ g/小鼠人重组IL-15以提供NK细胞支持。表4总结了在该研究中治疗的小鼠组。

[0654] 每周进行两次生物发光成像(BLI)以监测肿瘤负荷。每天检查小鼠的不适和耐受性的体征,并且从肿瘤接种之后一周开始每周测量体重两次。皮下注射150mg/kg D-萤光素15分钟之后对小鼠进行成像。使用Living Image软件(PerkinElmer)对整个小鼠的总通量(光子/秒)进行定量。当出现症状的骨髓瘤诸如后肢麻痹、梳毛和/或嗜睡时,处死荷瘤小鼠。将处死的时间用作存活的代表。在初始NK细胞给药用于组织收集之后43天处死所有存活的小鼠。在研究完成时,使用流式细胞术对来自生物样本的g-NK、cNK和MM.1S(CD138阳性/CD45阴性)细胞进行定量,以确定肿瘤负荷和NK细胞存活。

[0655] 表E4.MM功效研究设计

组号	臂	小鼠数量	抗体施用的天数	NK细胞施用的天数	
1	媒介物对照	8	N/A	N/A	
[0656]	2	g-NK I.V.+10 μ g 达雷妥尤单抗 I.P.+IL-15 I.P.*	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
	3	cNK I.V.+10 μ g 达雷妥尤	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
[0657]		单抗 I.P.+IL-15 I.P.*			

[0658] 与用cNK和达雷妥尤单抗治疗相比,g-NK和达雷妥尤单抗的共同给药导致显著的肿瘤抑制和提高的存活。如图14A所示,g-NK细胞加达雷妥尤单抗消除了7只小鼠中的5只小鼠中的骨髓瘤肿瘤负荷,这由在治疗5周之后的BLI成像证实。定量BLI分析表明,g-NK加达

雷妥尤单抗诱导持续且统计学上显著的肿瘤消退(图14B)。Kaplan-Meier存活分析表明,g-NK加达雷妥尤单抗处理的小鼠的总存活概率显著优于用媒介物或用cNK和达雷妥尤单抗处理的那些小鼠($p < 0.0001$) (图14C)。所有给予g-NK细胞的小鼠都是高能的,在研究结束时没有观察到体重减轻或毒性,而所有对照小鼠或用cNK细胞和达雷妥尤单抗处理的小鼠都具有严重的体重减轻,并且在研究结束前死于骨髓瘤(图14D)。有趣的是,用g-NK细胞处理的小鼠中的一只小鼠直到肿瘤接种之后第21天才给药,这是由于其中小鼠中的一只小鼠的麻醉诱导的窒息,并且该小鼠在研究结束时没有可检测到的肿瘤BLI,尽管g-NK小鼠具有最高的峰值BLI(图14A,小鼠标记为#)。在用g-NK细胞给药的7只小鼠中,仅2只小鼠具有最低可检测量的残存肿瘤BLI。

[0659] 骨髓的流式细胞术分析证实,没有可检测到的肿瘤BLI的5只g-NK处理的小鼠实际上是无肿瘤的(在骨髓中没有CD138阳性细胞)。相对于用cNK和达雷妥尤单抗处理的小鼠,所有7只g-NK处理的小鼠的平均肿瘤负荷降低了大于99% ($p < 0.001$; 图14E)。描绘骨髓中的肿瘤负荷和持续NK细胞的代表性流式细胞术点图示于图14F中。在研究过程中拍摄的所有BLI图像示于图14G中。在处死前从所有小鼠获得X射线图像,并且确定对照小鼠或用cNK细胞和达雷妥尤单抗处理的小鼠具有后肢骨骼的骨折和畸形,而用g-NK细胞和达雷妥尤单抗处理的小鼠中的一只小鼠具有任何骨骼畸形(图14H)。

[0660] 血、脾和骨髓中的NK细胞分析表明,相对于cNK细胞,在达雷妥尤单抗处理的小鼠中,g-NK细胞的持久性大大增加(图15A至图15C)。值得注意的是,血液中的g-NK细胞数量比cNK细胞高>90% (图15A),脾中高>95% (图15B),并且骨髓中高>99% (图15C)。

[0661] 总之,这些结果进一步支持g-NK细胞(包括与cNK细胞相比)在增强体内mAb效果方面的优越性,并且表明与达雷妥尤单抗组合给予的g-NK细胞可潜在地治愈MM。此外,这些结果支持提高的存活和对同种相杀的抗性导致优良的抗肿瘤效果和g-NK细胞的持久性。

[0662] 实施例11:在淋巴瘤的弥散性原位异种移植Raji模型中的体内功效

[0663] 通过在淋巴瘤的鼠模型中测量肿瘤抑制和存活来评价NK细胞(扩增的g-NK细胞或cNK细胞)与利妥昔单抗组合的体内功效。

[0664] 在扩增g-NK细胞之后,将大约 5×10^5 个萤光素酶标记的Raji人淋巴瘤细胞静脉内注射到雌性NSG小鼠的尾静脉中,并使其生长2天。单克隆抗体利妥昔单抗(抗CD20)在肿瘤接种之后两周开始,每周以 $200 \mu\text{g}$ /小鼠经由I.P.途径联合静脉内施用 15×10^6 个扩增的g-NK或cNK细胞施用。在肿瘤接种之后两天开始,每三天施用IL-15以提供NK细胞支持。表5总结了在该研究中治疗的小鼠组。

[0665] 表E5.淋巴瘤功效研究设计

组号	臂	小鼠数量	抗体施用的天数	NK细胞施用的天数
1	媒介物对照	8	N/A	N/A
[0666] 2	g-NK I.V.+ $200 \mu\text{g}$ 利妥昔单抗 I.P.+IL-15 I.P. (每3天)	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
3	cNK I.V.+ $200 \mu\text{g}$ 利妥昔单抗 I.P.+IL-15 I.P. (每3天)	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42

[0667] 在肿瘤接种后一周开始,每周进行一次生物发光成像(BLI)以监测肿瘤负荷。每天检查小鼠的不适和耐受性的体征,并且从肿瘤接种之后一周开始每周测量体重两次。皮下注射 $150 \text{mg}/\text{kg}$ D-萤光素15分钟之后对小鼠进行成像。使用Living Image软件

(PerkinElmer)对整个小鼠的总通量(光子/秒)进行定量。当发生有症状的淋巴瘤时,处死携带肿瘤的小鼠。将处死的时间用作存活的代表。在研究完成时,使用流式细胞术来定量g-NK、cNK和Raji。

[0668] 与用cNK和利妥昔单抗治疗相比,g-NK和利妥昔单抗的共同给药导致显著的肿瘤抑制和提高了的存活。如图16A所示,当与利妥昔单抗体内组合时,扩增的g-NK细胞具有显著增强的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。定性BLI分析(光子/秒)示出,相对于用cNK细胞或无处理的利妥昔单抗,g-NK细胞加利妥昔单抗导致Raji淋巴瘤细胞的存在有统计意义上的显著降低。Kaplan-Meier生存分析示出,与用利妥昔单抗和cNK细胞处理或不处理的小鼠相比,g-NK加利妥昔单抗处理的小鼠的总生存概率显著改善(图16B)。

[0669] 所有给予g-NK细胞的小鼠都是高能的,在研究结束时没有观察到体重减轻或毒性,而所有未接受任何治疗的小鼠在研究结束之前死于淋巴瘤(图16B和图16C)。相对于接受g-NK细胞加利妥昔单抗的小鼠,接受利妥昔单抗和cNK细胞的小鼠示出显著的体重减轻(图16C)。

[0670] 总之,这些结果进一步支持g-NK细胞(包括与cNK细胞相比)在增强体内mAb效果方面的优越性,并且表明与利妥昔单抗组合给予的g-NK细胞可潜在地治愈淋巴瘤。

[0671] 本发明并不旨在将范围限制于具体公开的实施方案,提供这些实施方案是例如为了举例说明本发明的各个方面。根据本文的描述和教导,对这些组合物和方法的各种修改将变得显而易见。可在不脱离本公开的真实范围和精神的情况下实践此类变型,并且此类变型旨在落入本公开的范围之内。

序列表

- <110> 因达普塔治疗公司
 <120> 自然杀伤细胞组合物的治疗和给药方法
 <130> 77603-2001240
 <140> 尚未受让
 <141> 与本申请同时提交
 <150> 63177956
 <151> 2021-04-21
 <160> 18
 <170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ
 <210> 1
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <223> 人FcRγ链(NP_004097.1(GI:4758344))
 <400> 1

```

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1           5           10           15
Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
           20           25           30
Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
           35           40           45
Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
           50           55           60
Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65           70           75           80
His Glu Lys Pro Pro Gln
           85
  
```

- <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 引物
 <400> 2
 atatttacag aatggcacag g 21
 <210> 3

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 3
gacttggtag ccaggttgaa 20
<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 4
atcagattcg atcctacttc tgcagggggc at 32
<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 5
acgtgctgag cttgagtgat ggtgatgttc ac 32
<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 6
cccaactcaa cttcccagtg tgat 24
<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 7
gaaatctacc ttttctcta atagggaat 30

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 8
gaaatctacc ttttcctcta atagggcaa 29
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 9
gaaatctacc ttttcctcta atagggca 28
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 10
ccaaaagcca cactcaaaga c 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 11
accaggtgg aaagaatgat g 21
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<400> 12

aacatcacca tcactcaagg tttgg 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

ctgaagacac atttttactc ccaaa 25

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

tccaaaagcc aactcaaag ac 22

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 15

ctgaagacac atttttactc ccaac 25

<210> 16

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD16 (F158)

<400> 16

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Glu	Pro
1			5						10					15	
Gln	Trp	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln
			20					25					30		
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
		35					40					45			
Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr
	50					55					60				
Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu
65					70					75					80
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
				85					90						95
Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
			100						105					110	
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
			115				120						125		
Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Tyr	Ile	Pro
						135						140			
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Val
145					150					155					160
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln
				165					170						175
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln
			180						185					190	
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly
			195					200					205		
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp
			210				215					220			
Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys		
225					230					235					

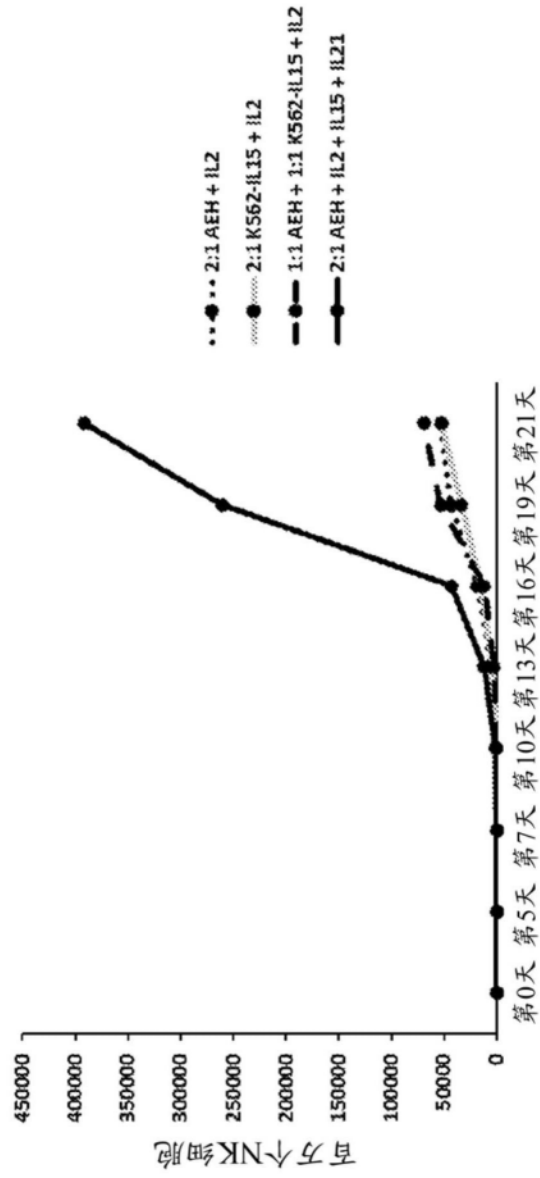


图1A

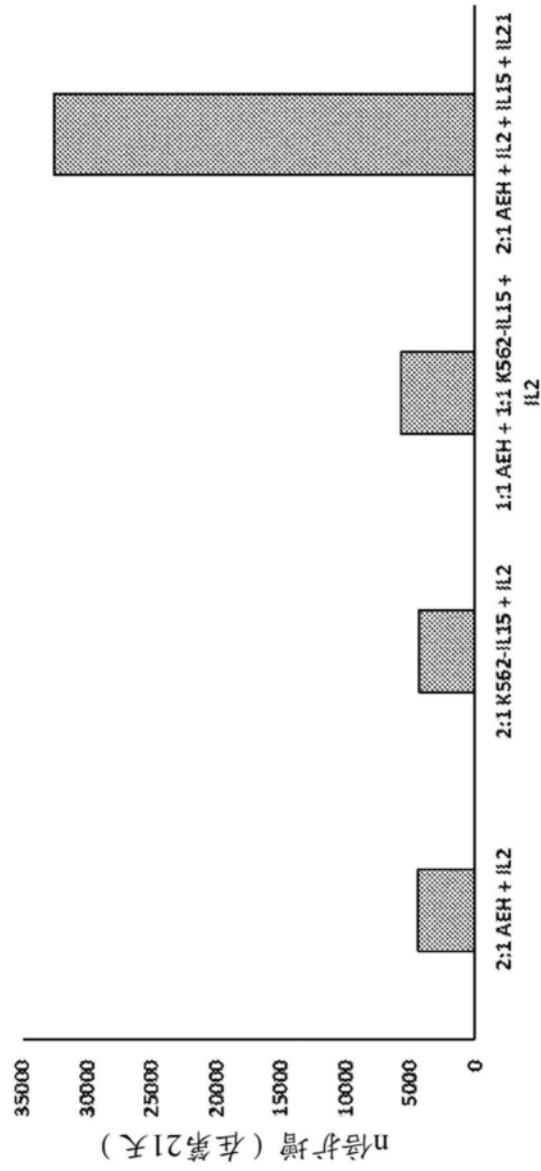


图1B

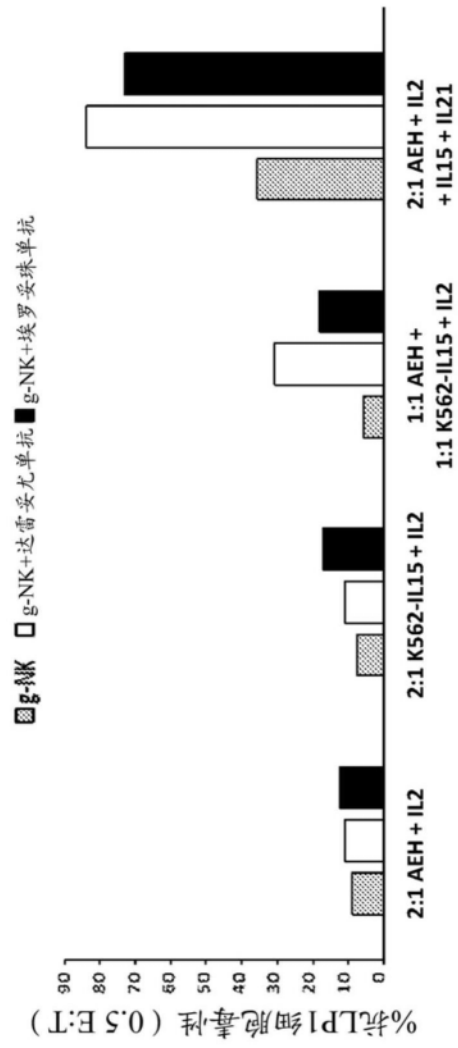


图2A

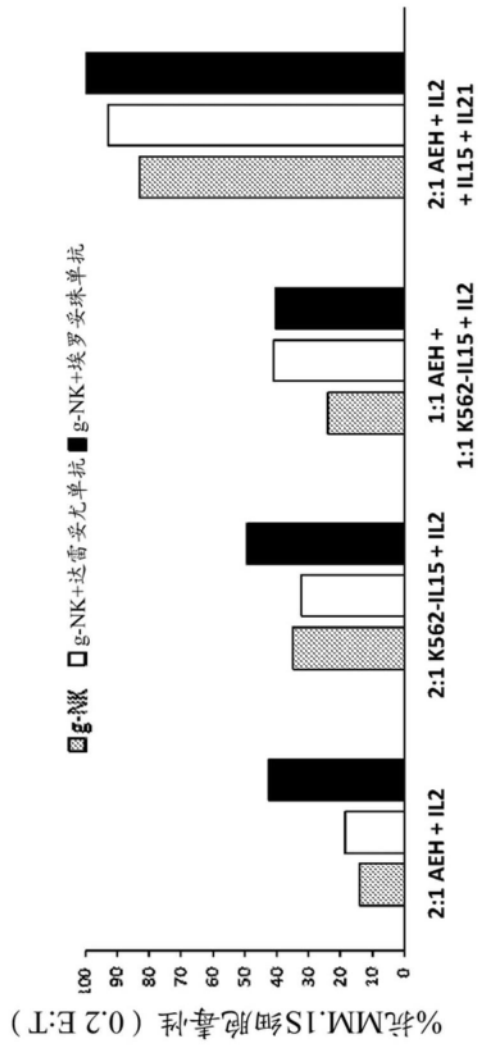


图2B

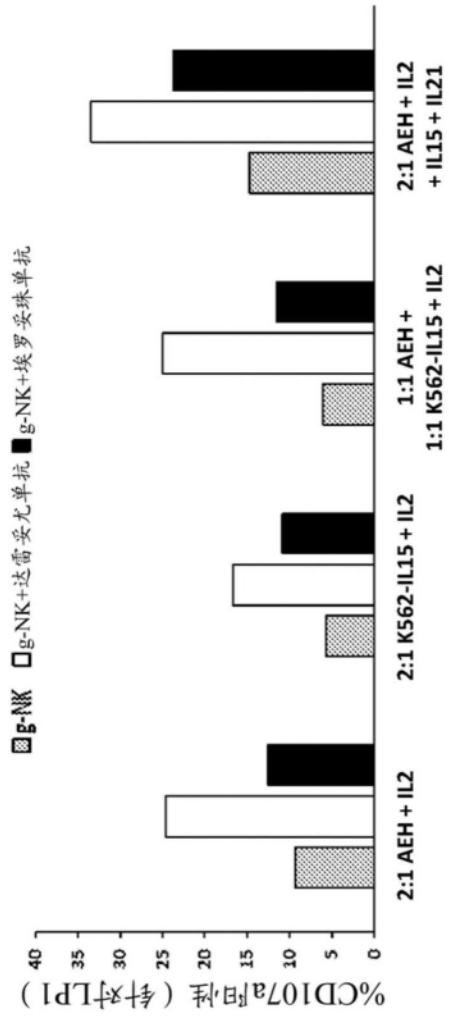


图3A

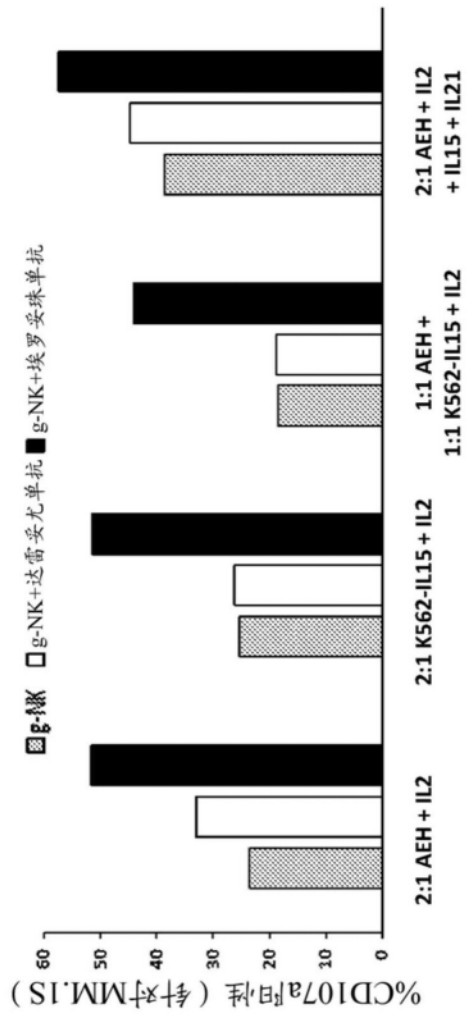


图3B

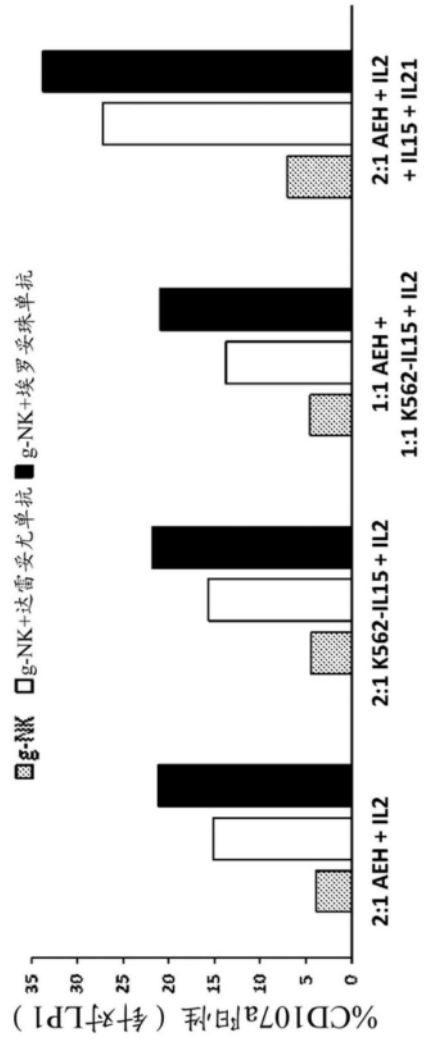


图3C

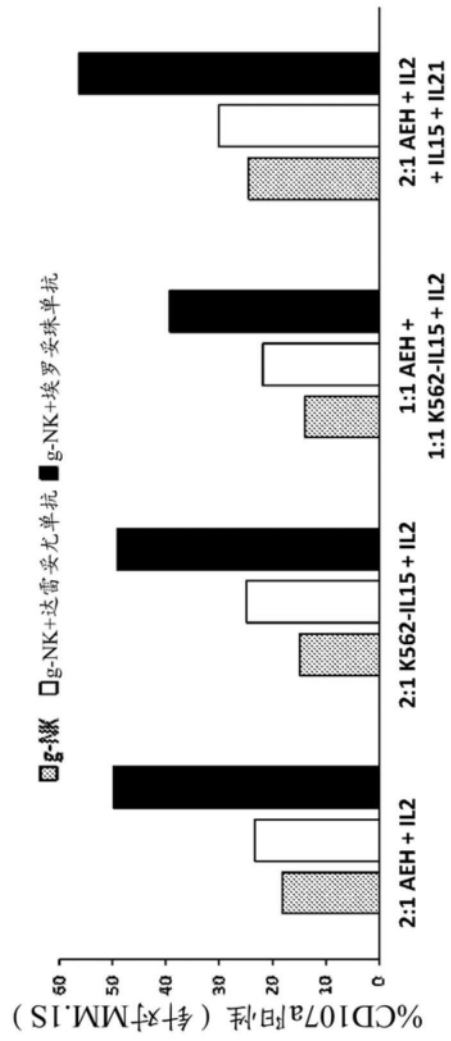


图3D

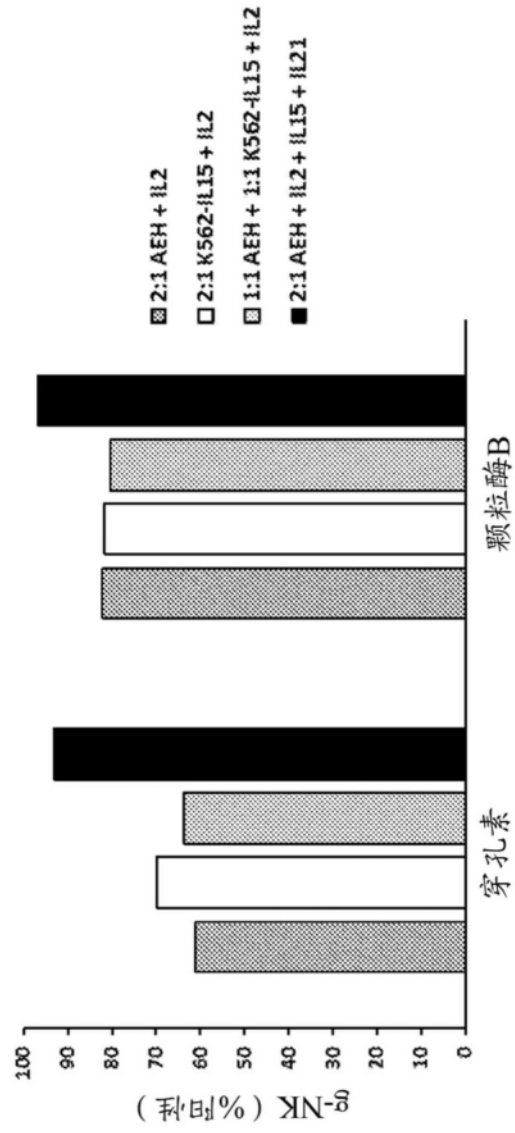


图4A

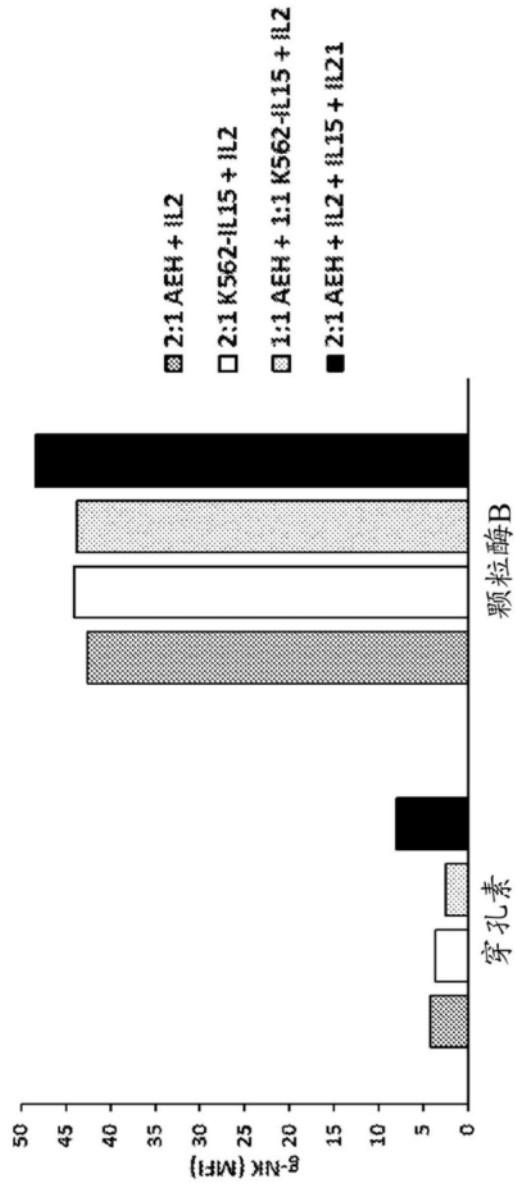


图4B

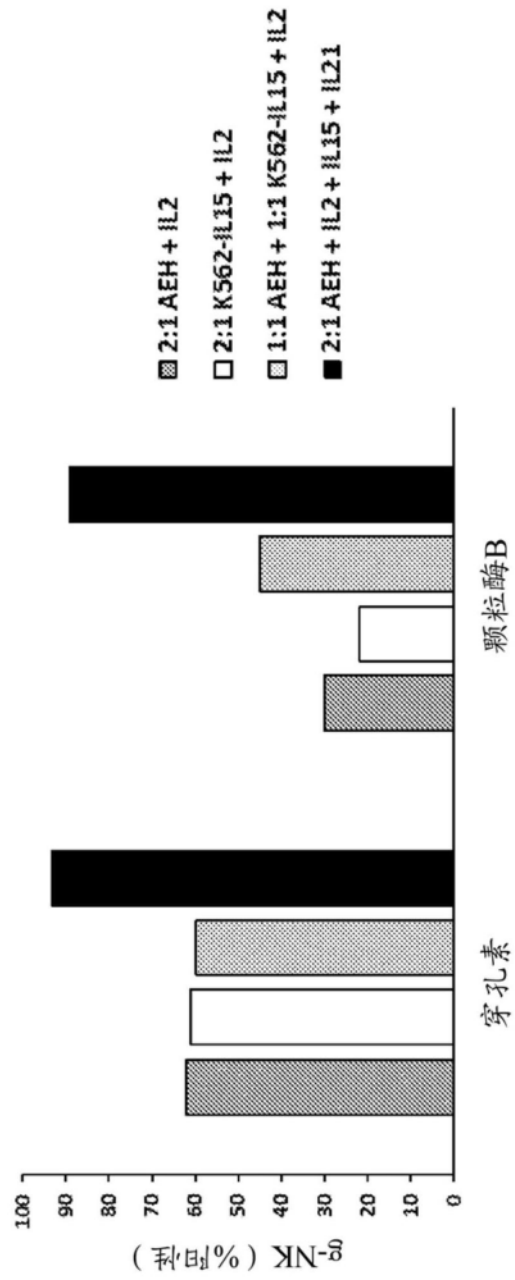


图4C

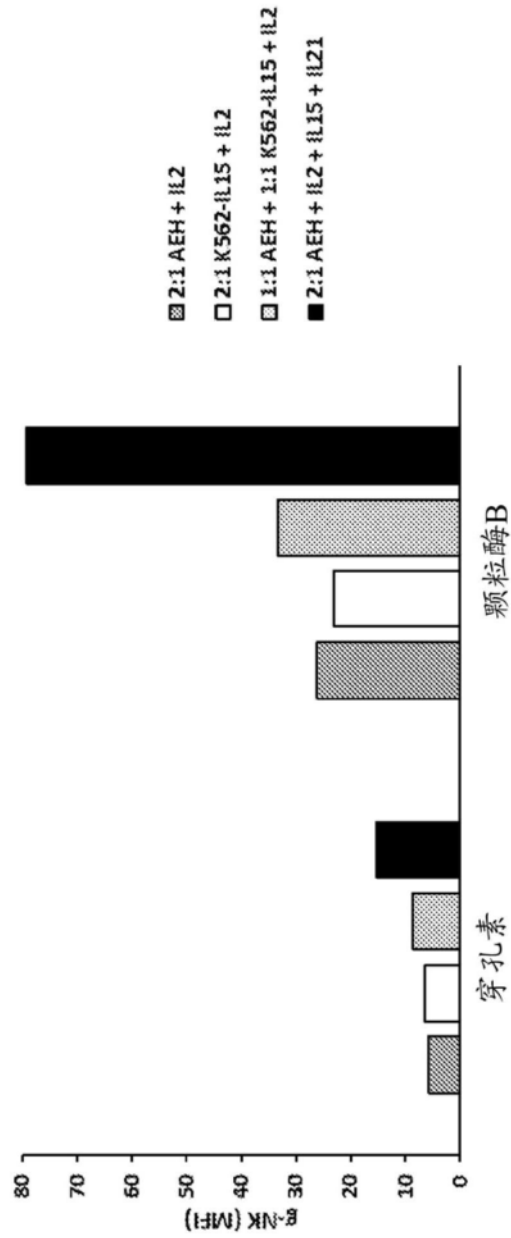


图4D

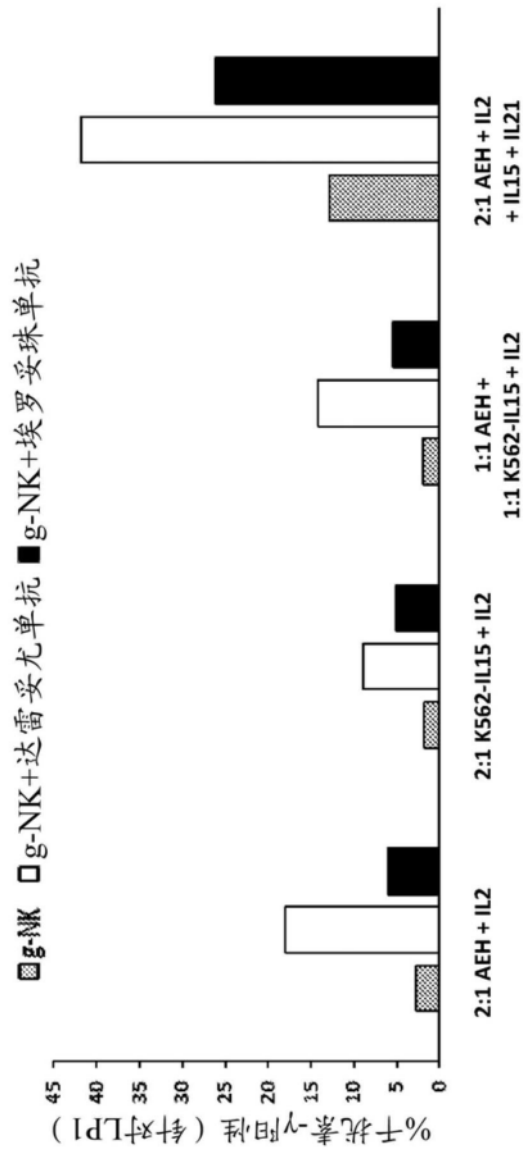


图5A

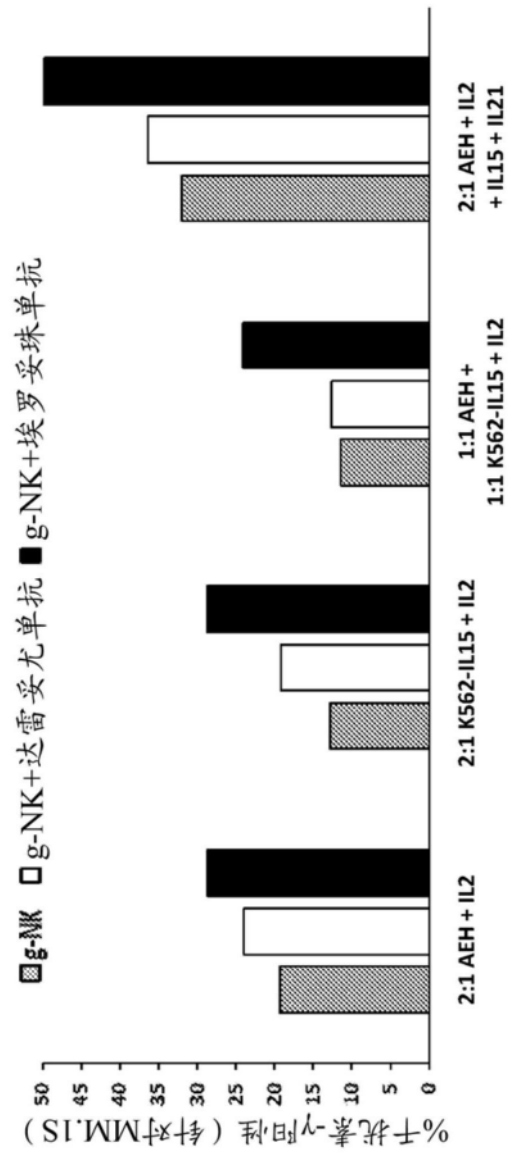


图5B

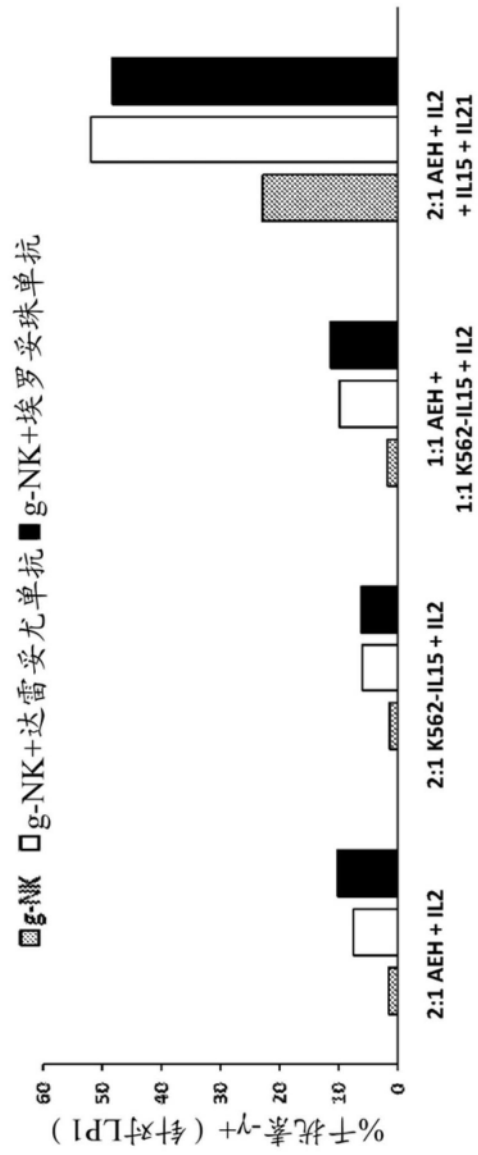


图5C

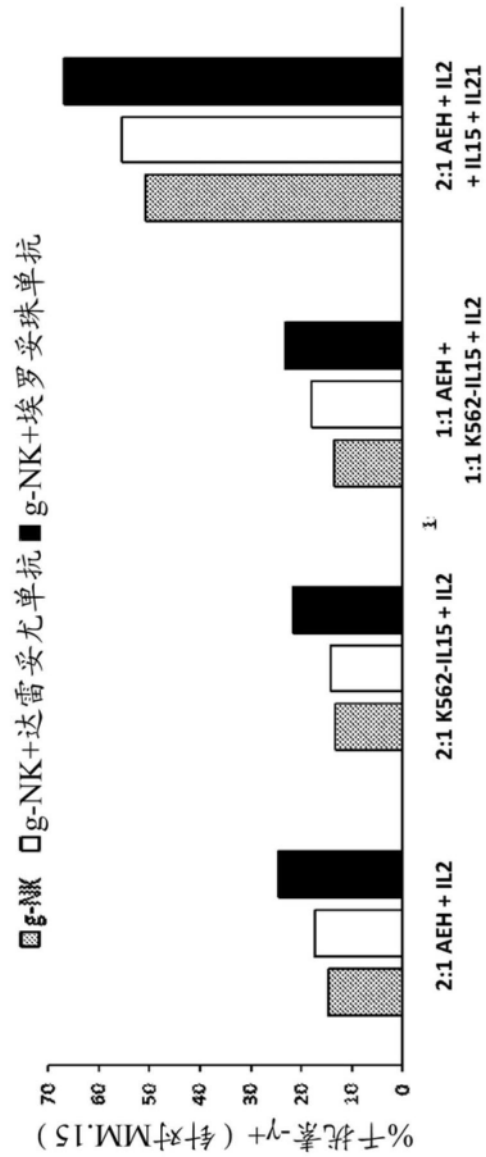


图5D

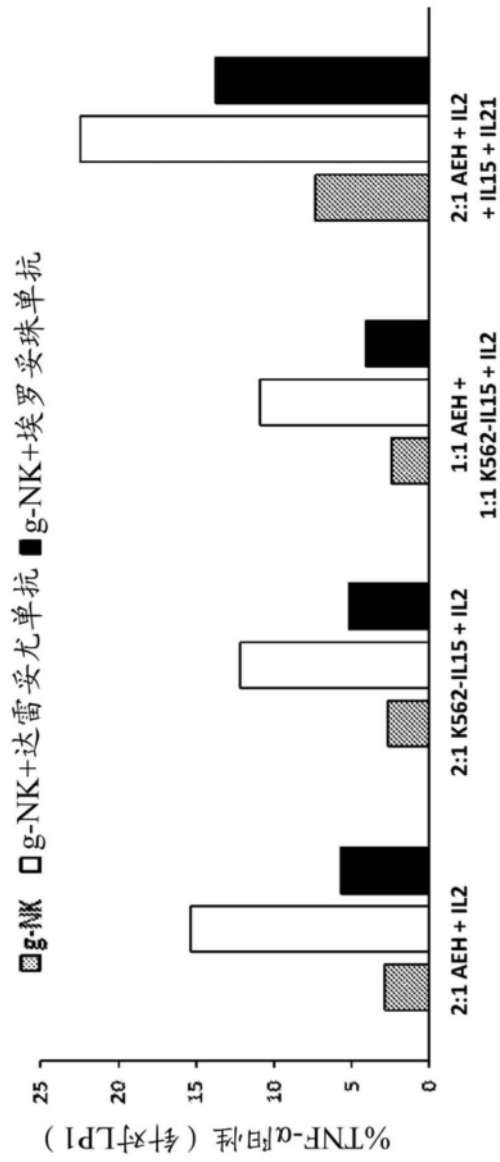


图6A

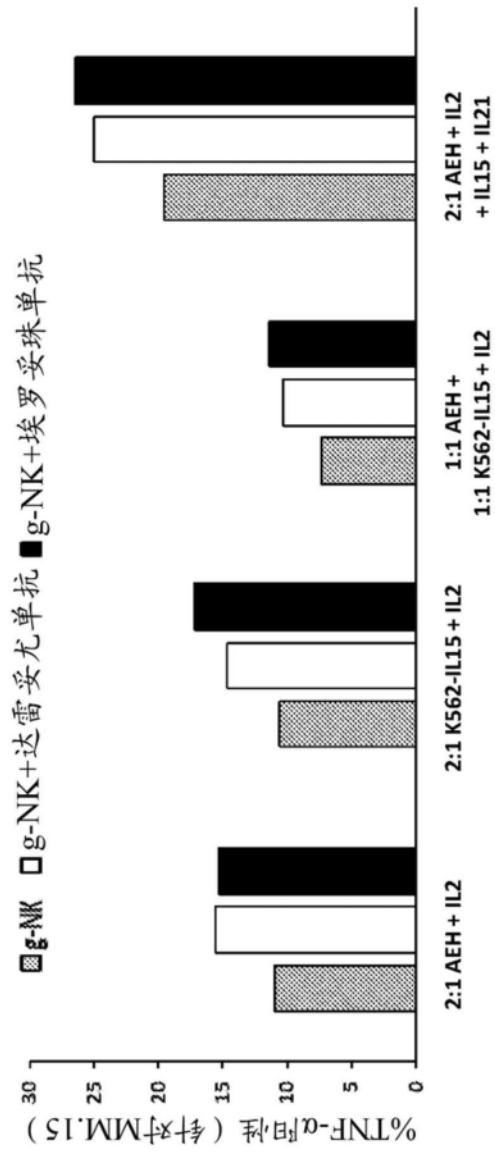


图6B

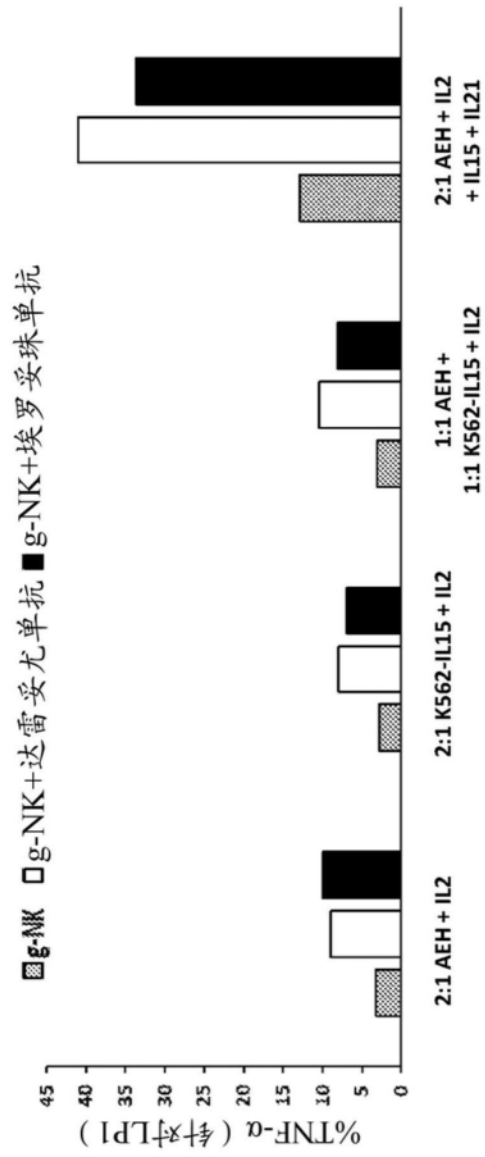


图6C

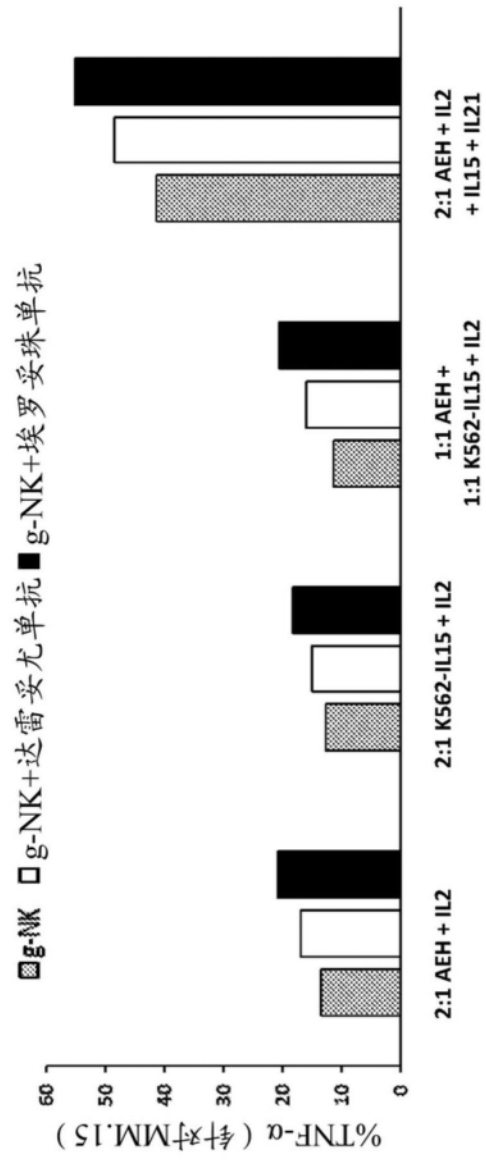


图6D

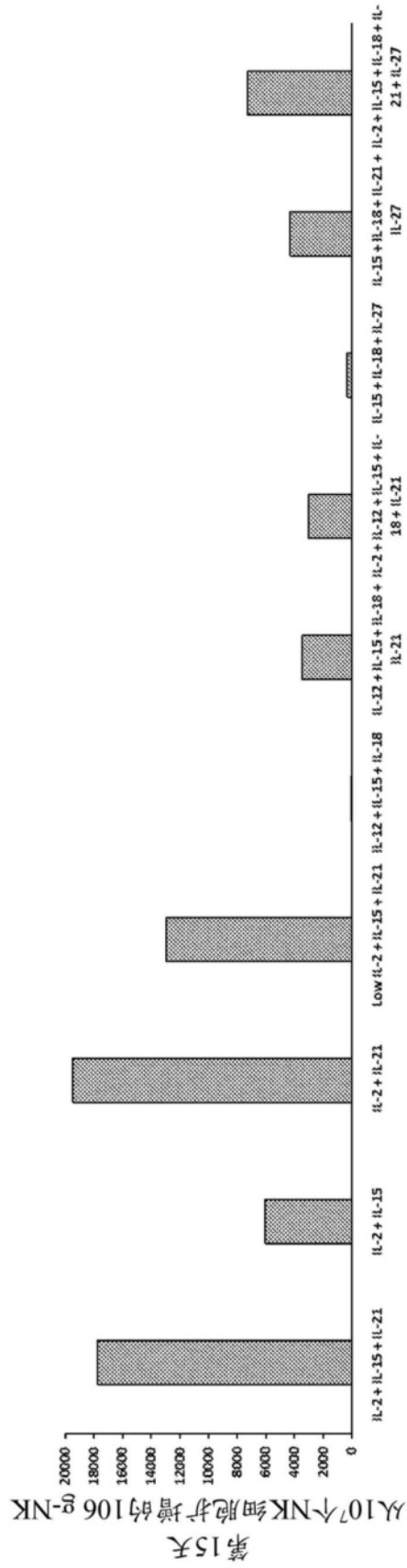


图7

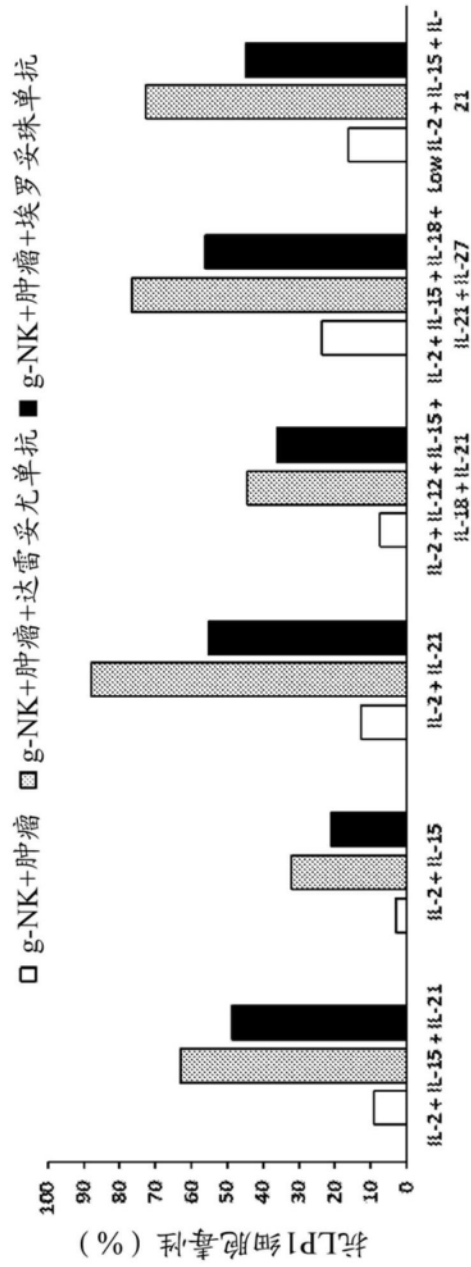


图8A

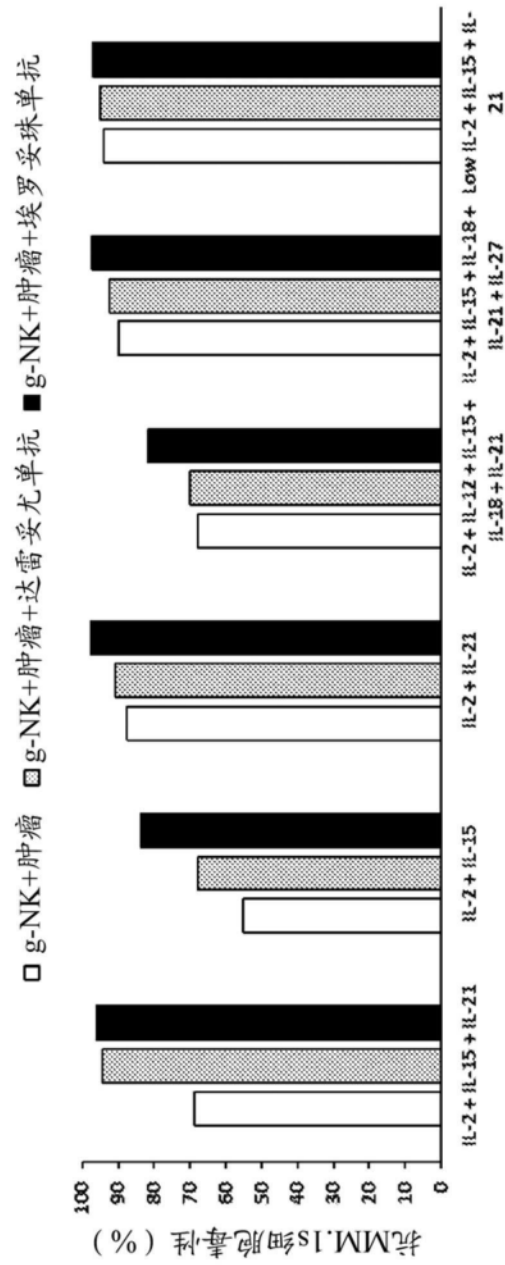


图8B

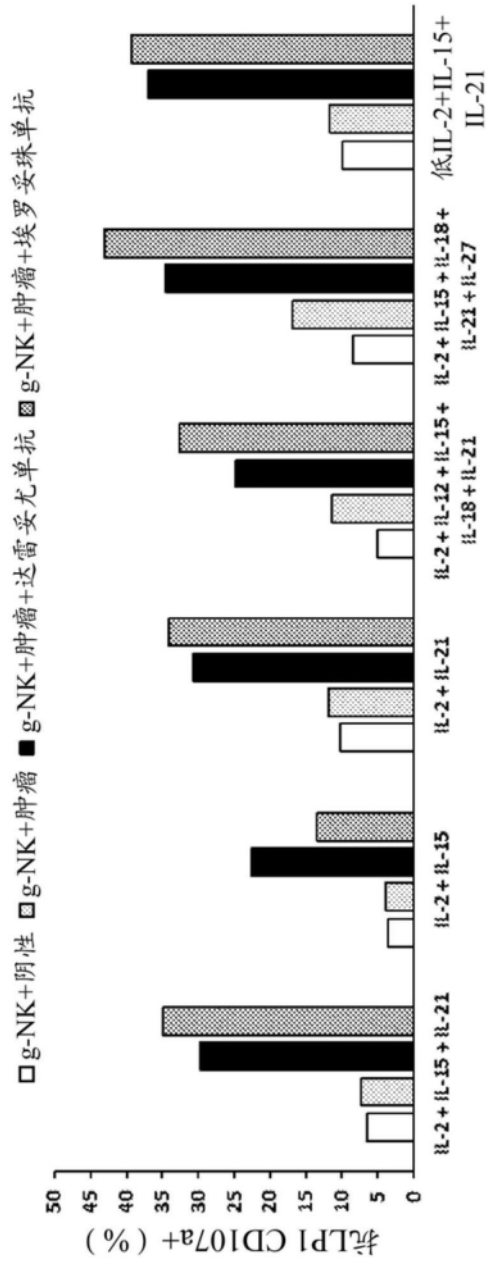


图8C

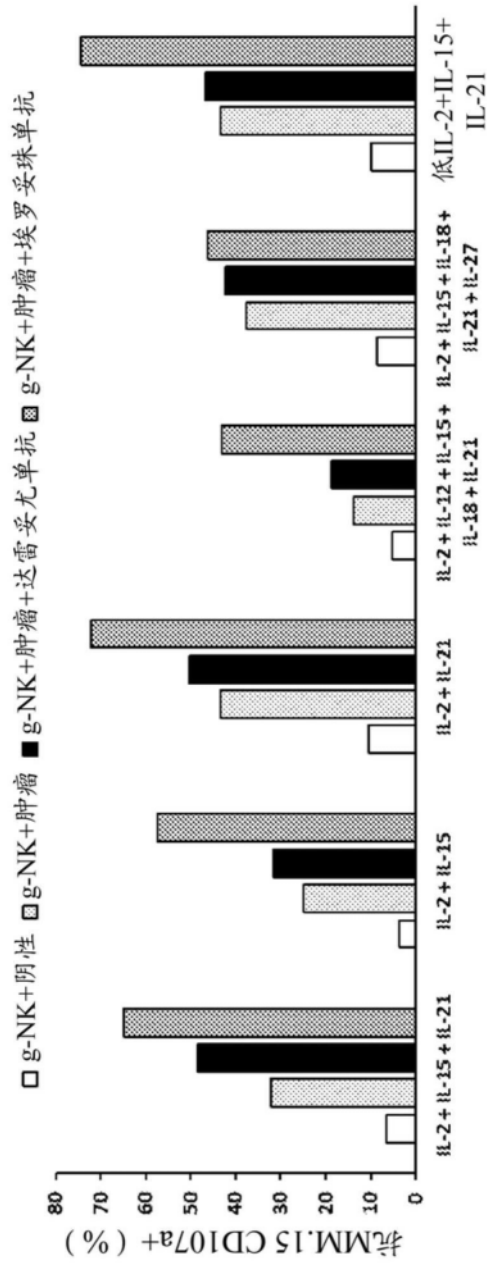


图8D

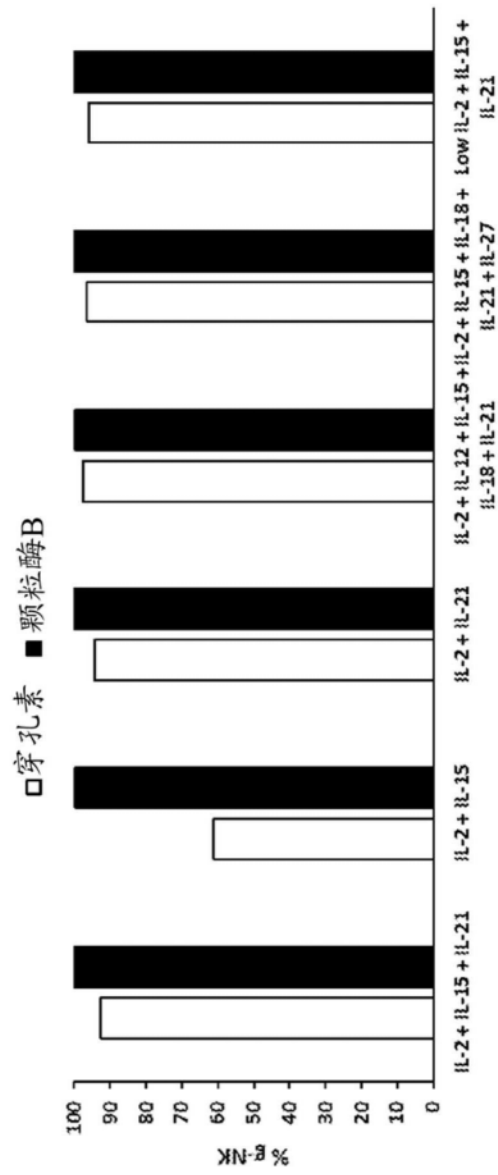


图8E

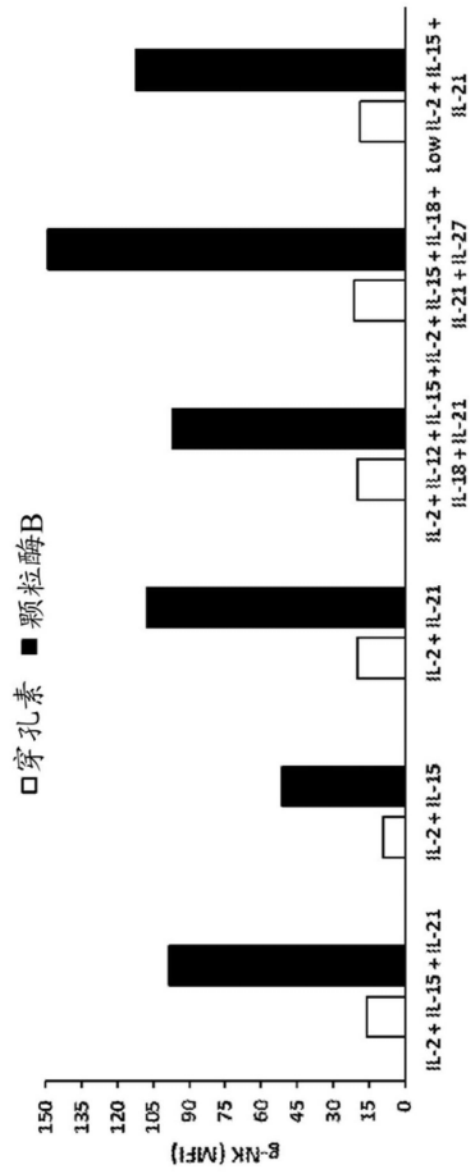


图8F

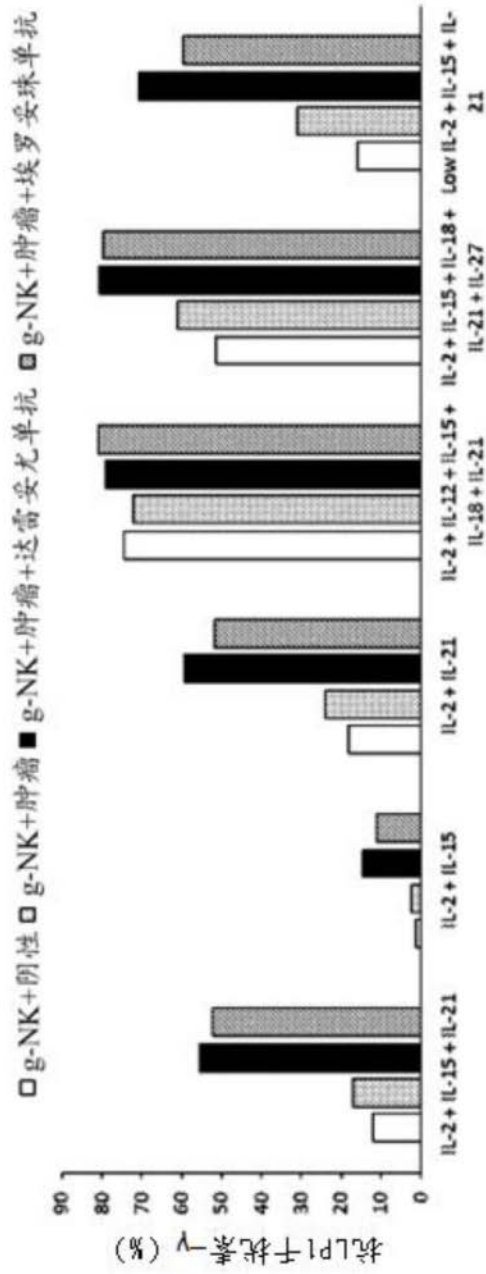


图8G

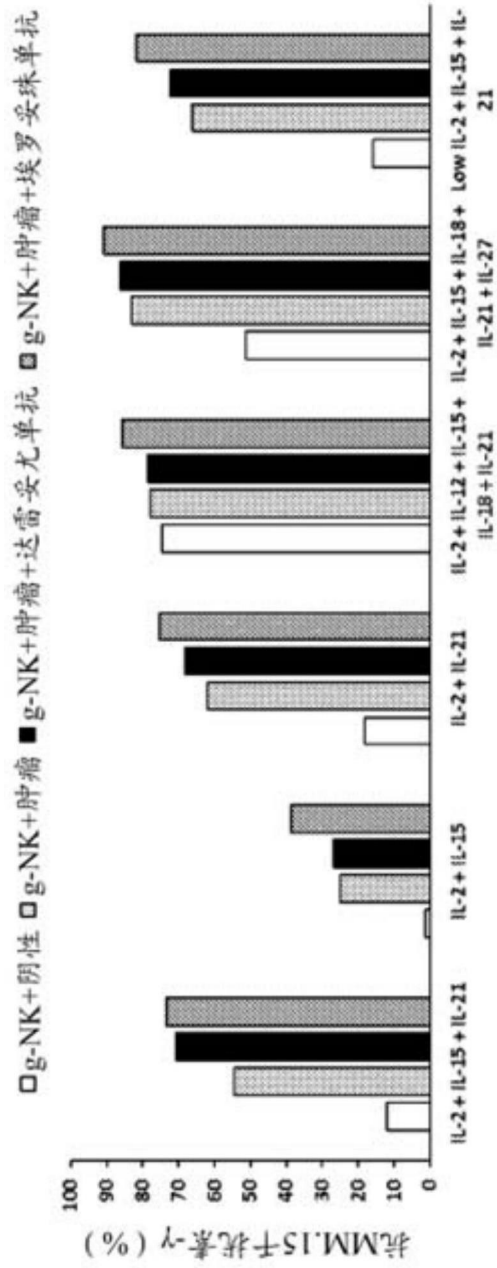


图8H

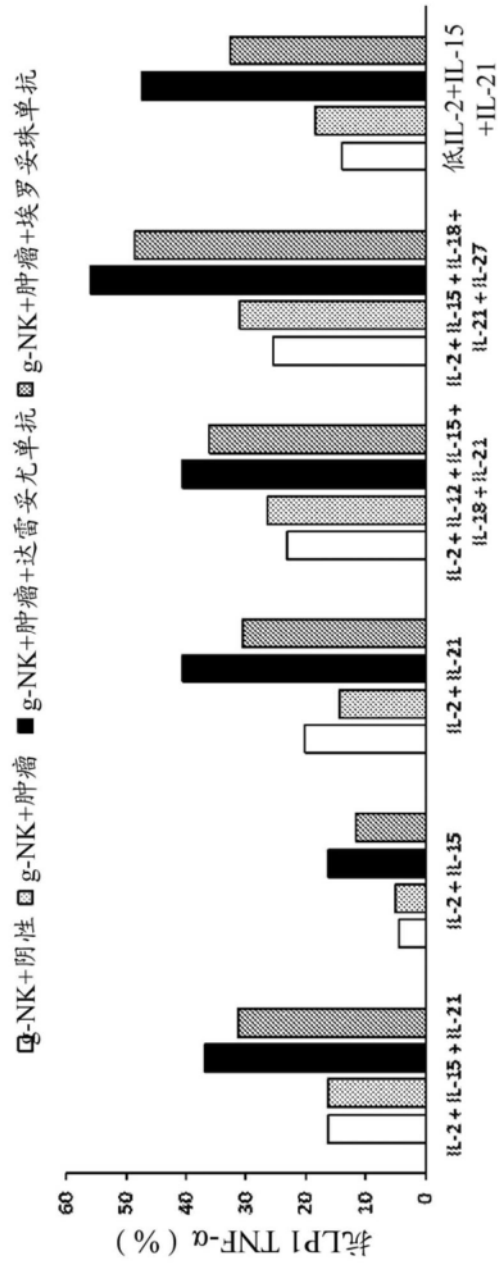


图8I

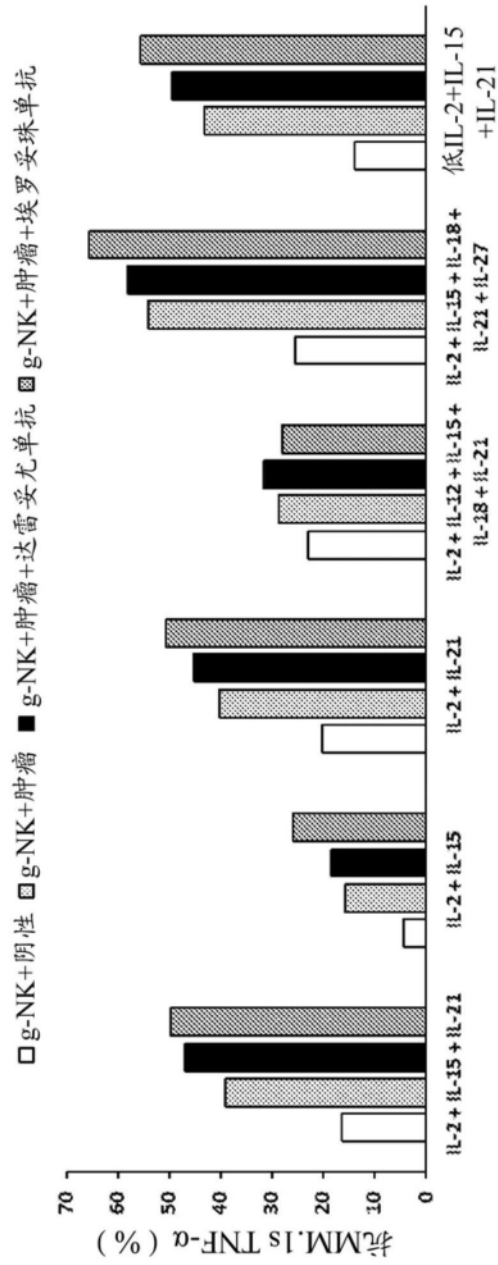


图8J

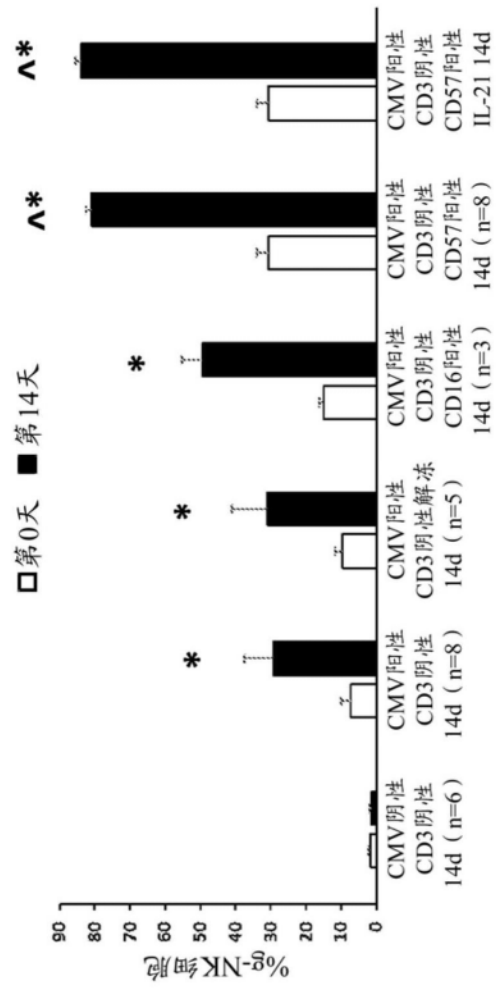


图9A

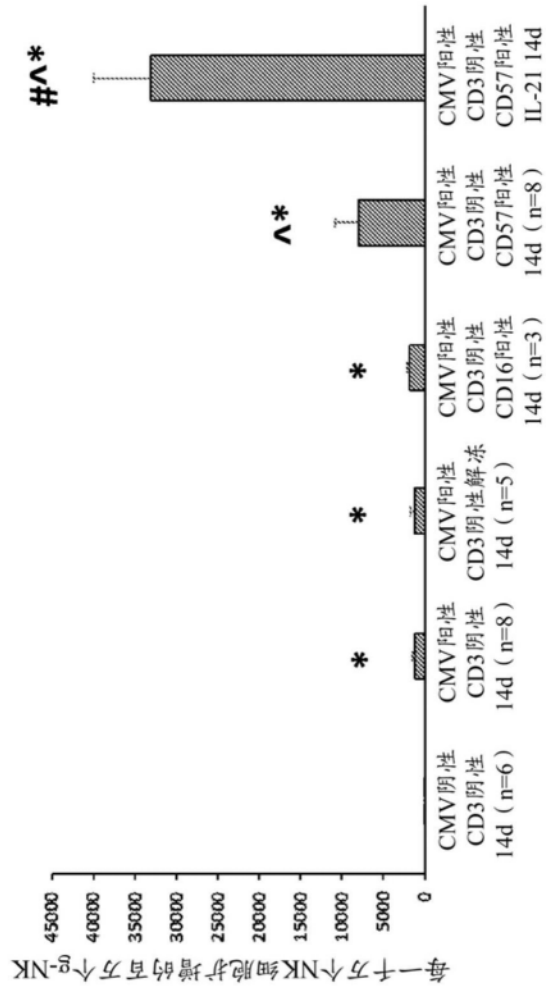


图9B

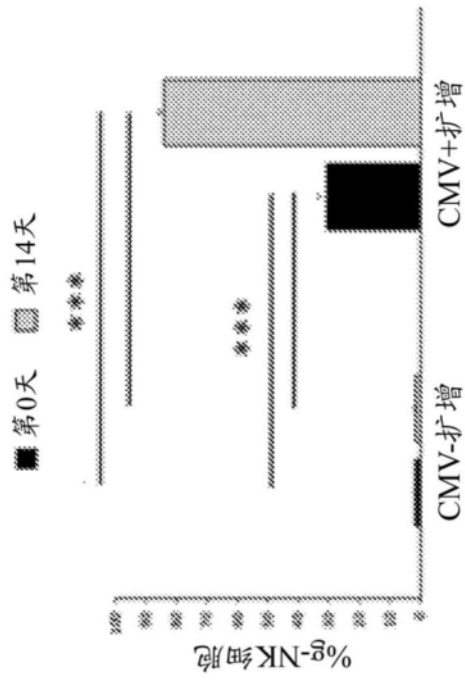


图9C

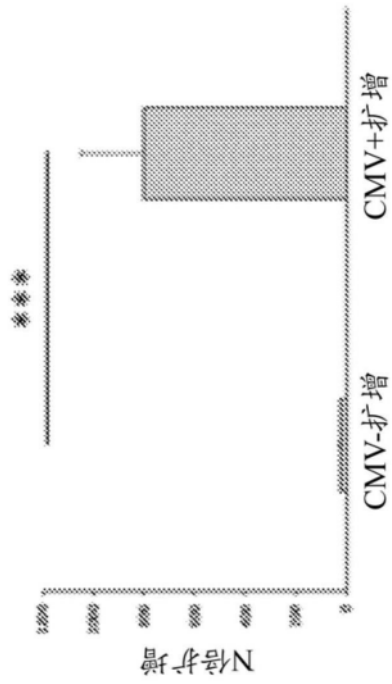


图9D

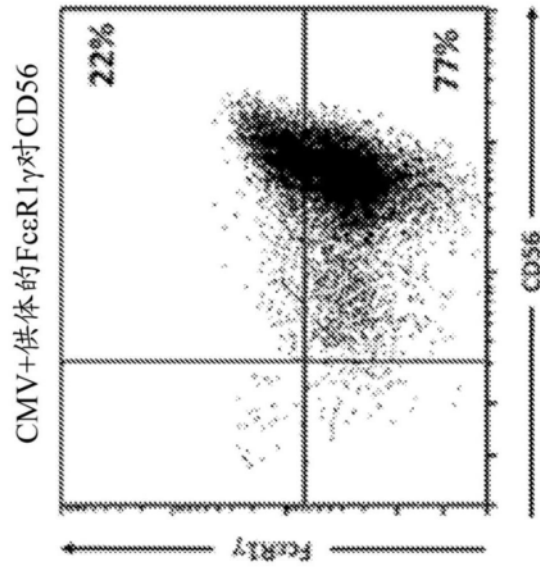


图9E

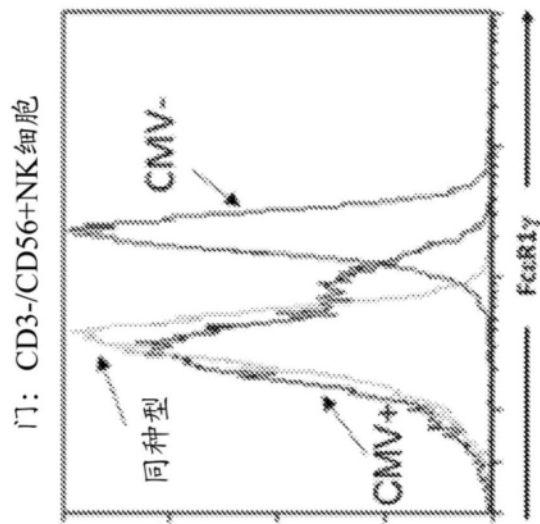


图9F

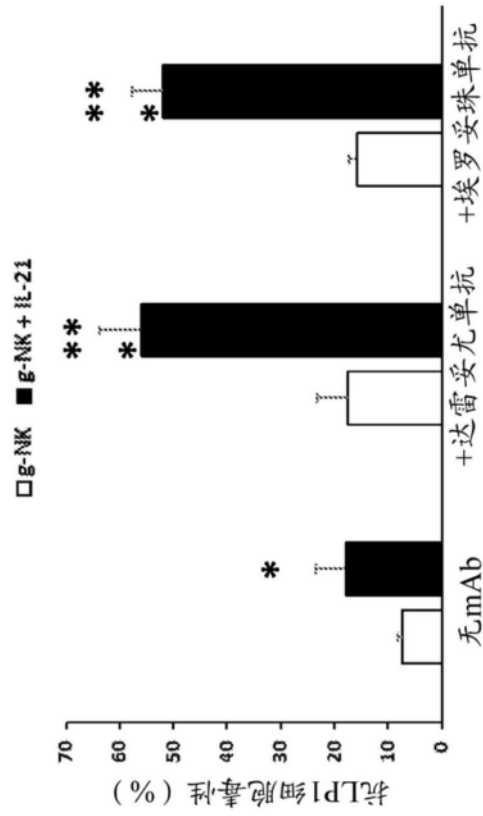


图9G

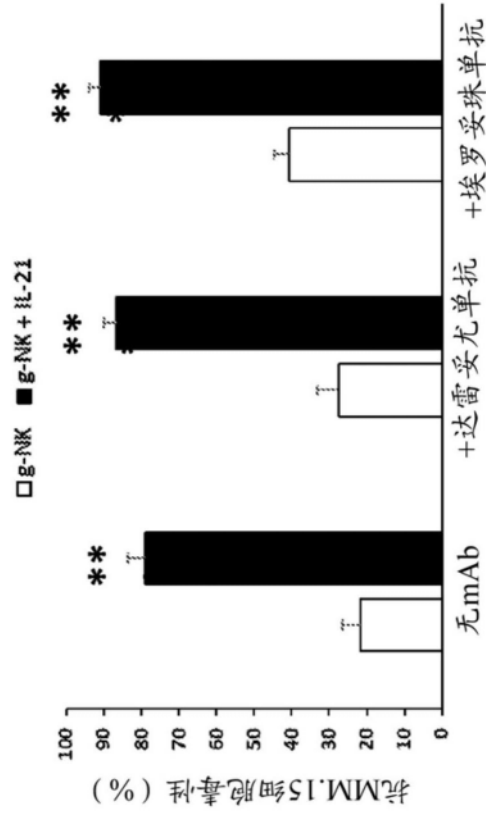


图9H

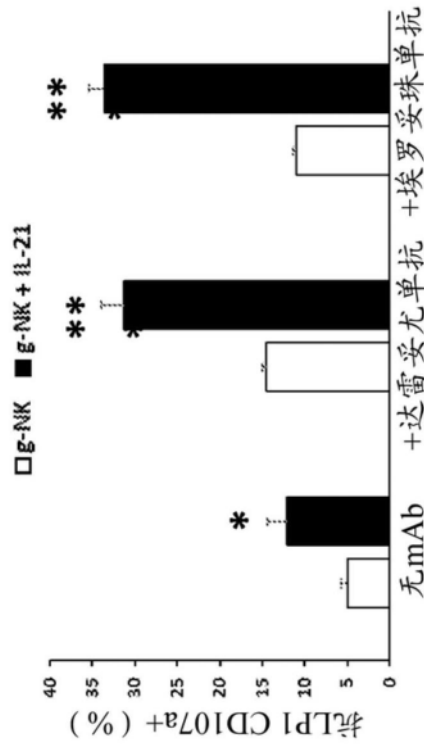


图9I

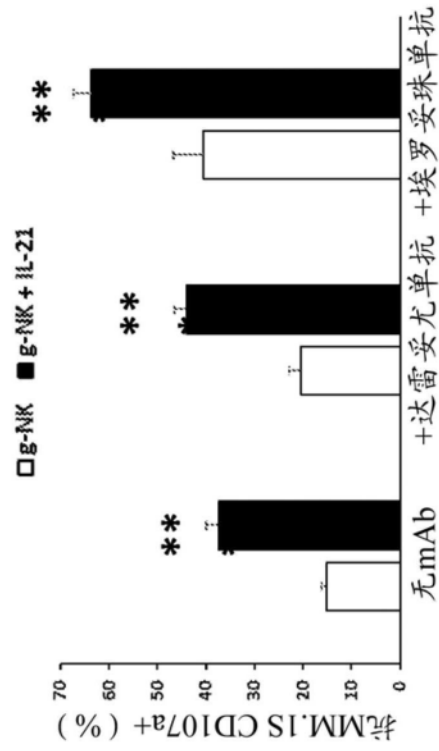


图9J

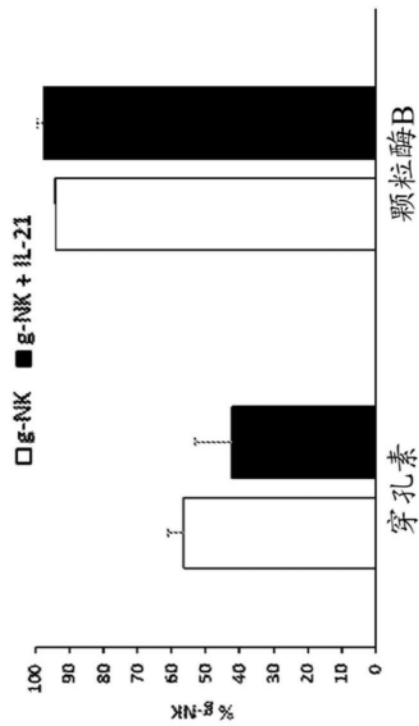


图9K

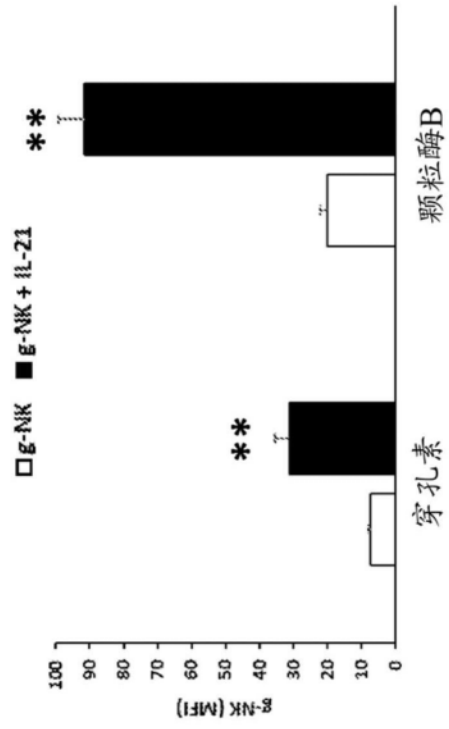


图9L

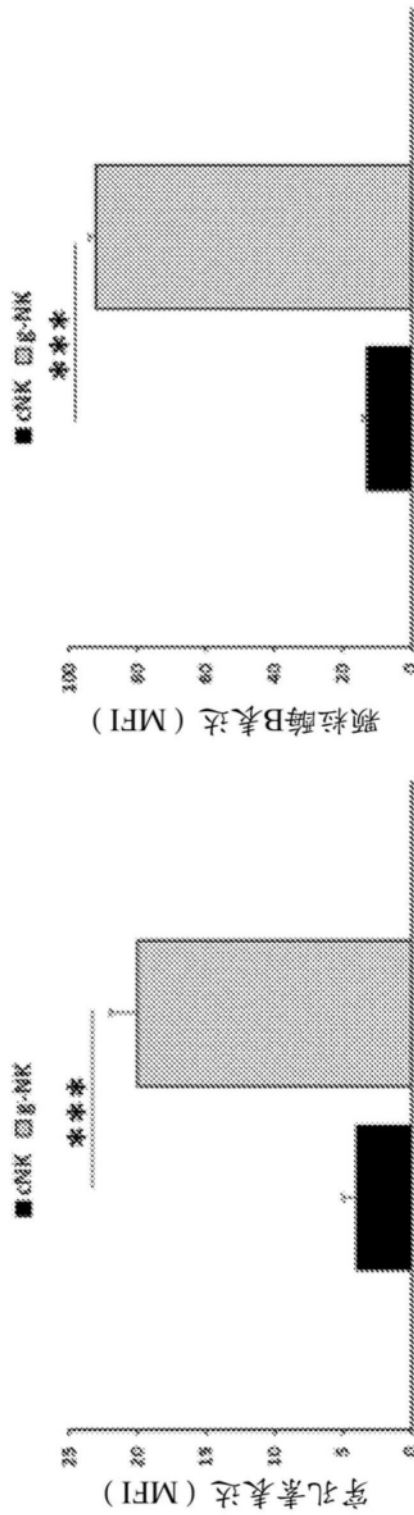


图9M

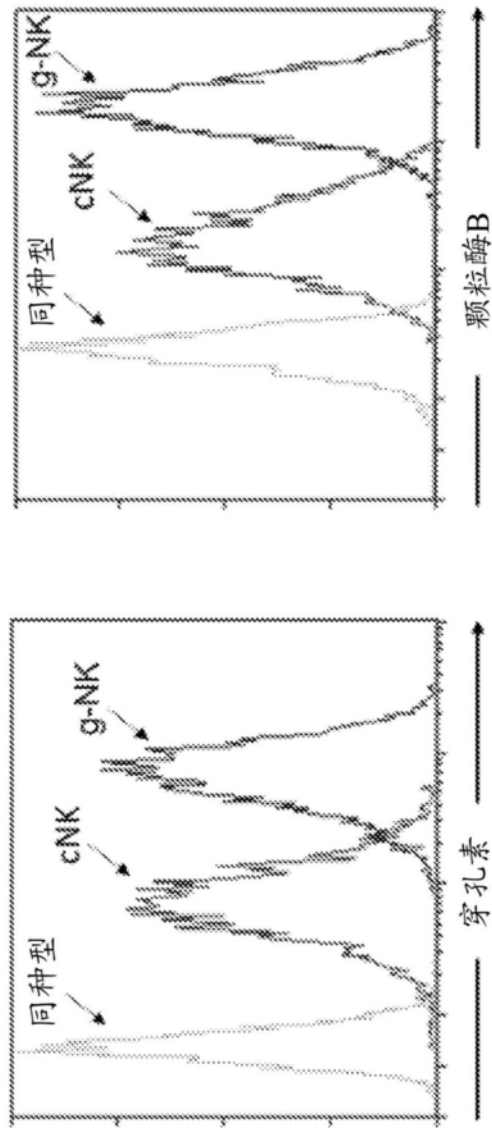


图9N

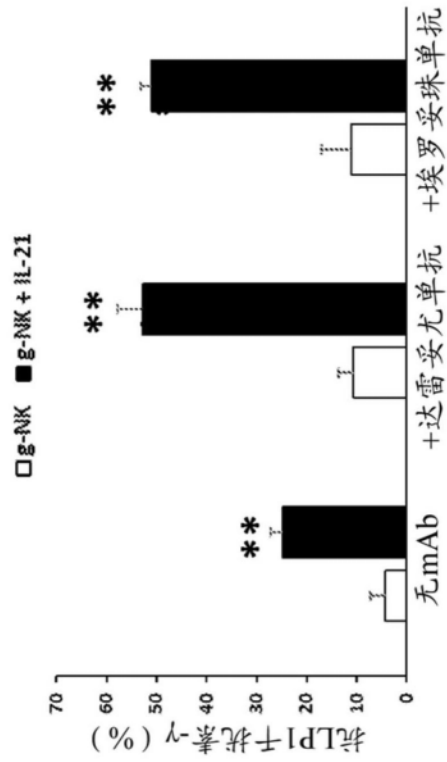


图90

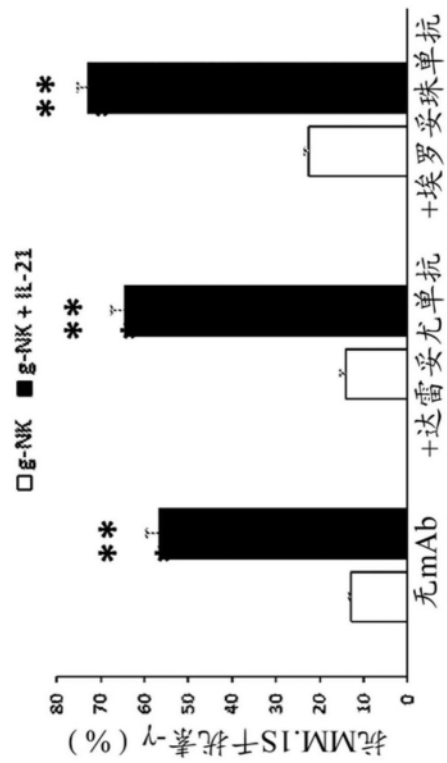


图9P

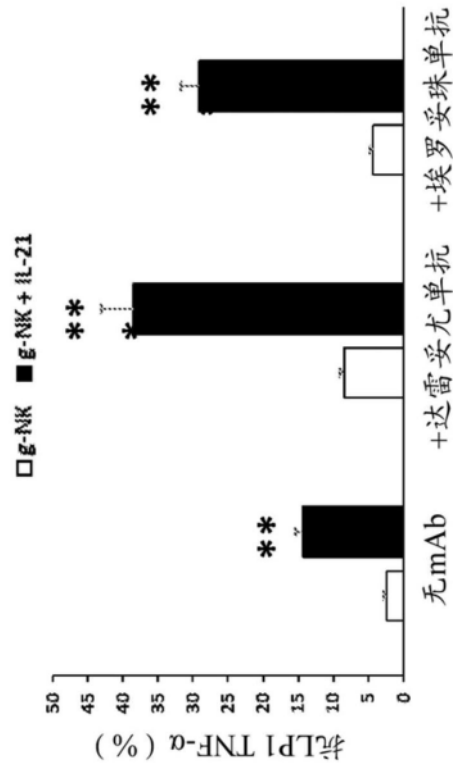


图9Q

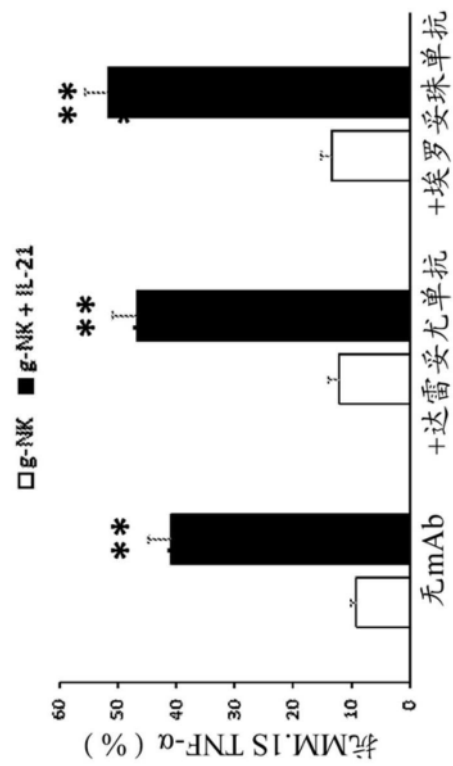


图9R

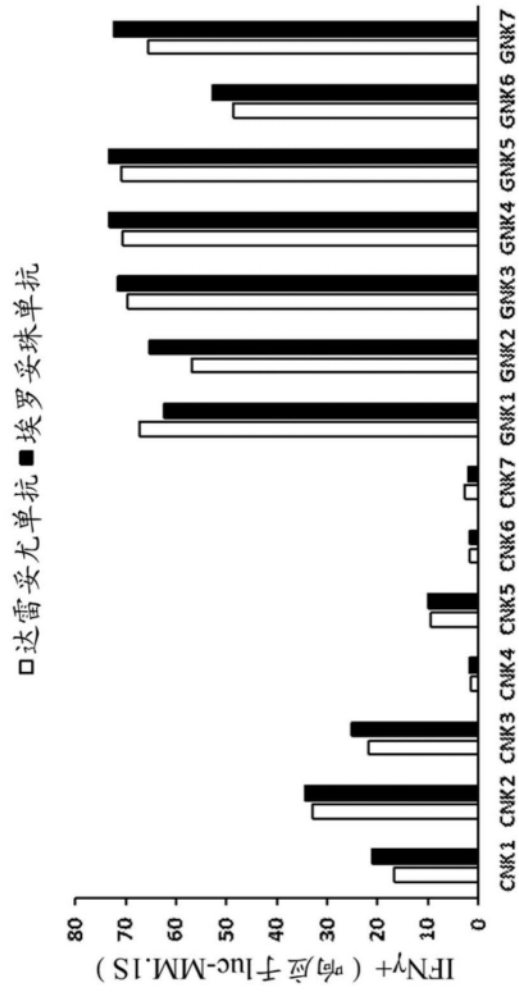


图9S

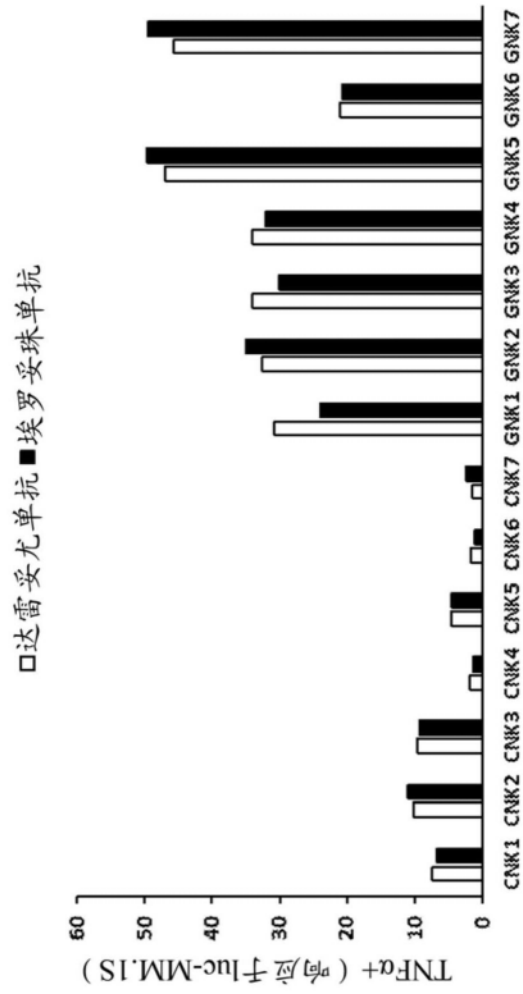


图9T

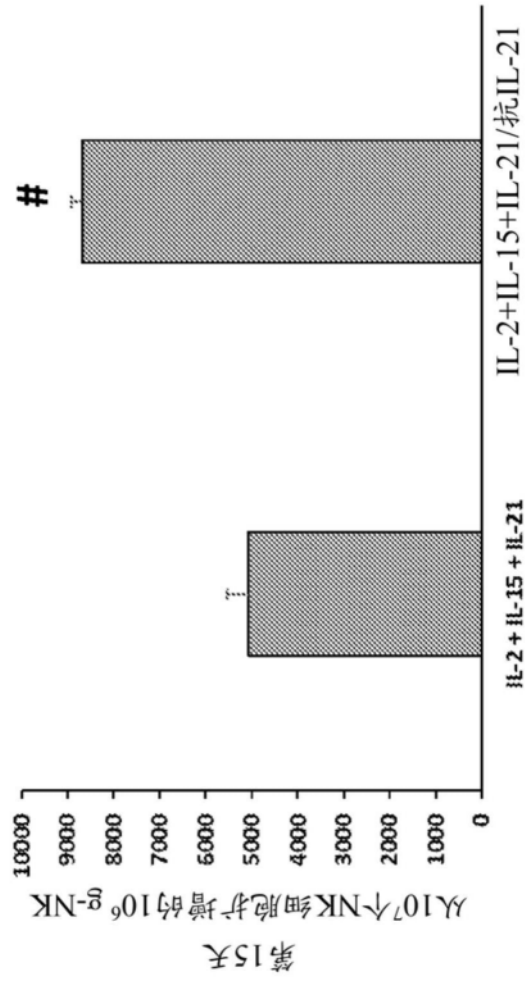


图10

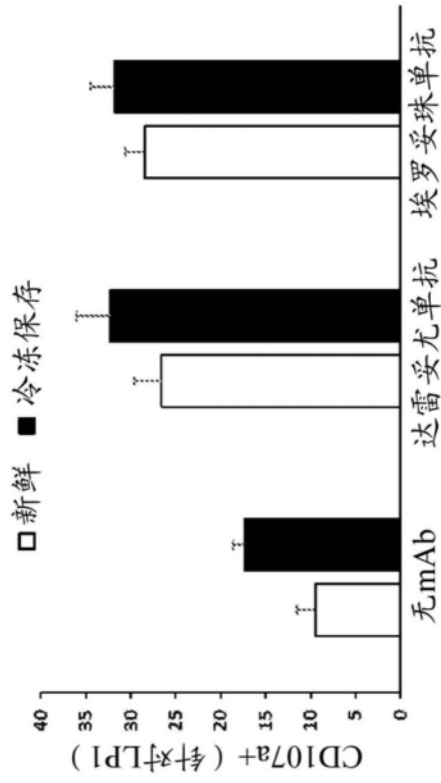


图11A

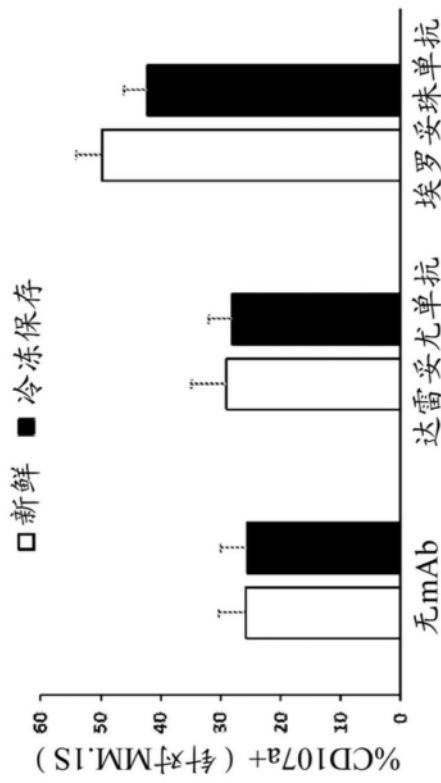


图11B

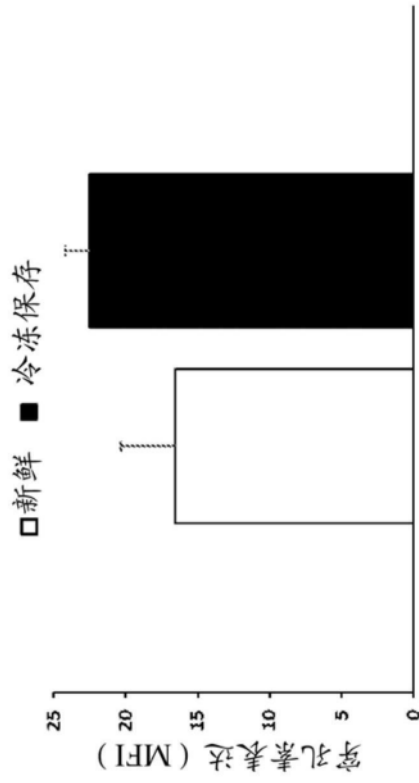


图11C

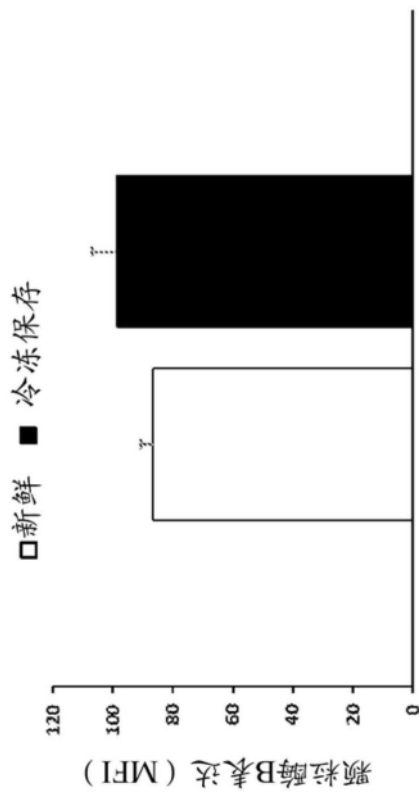


图11D

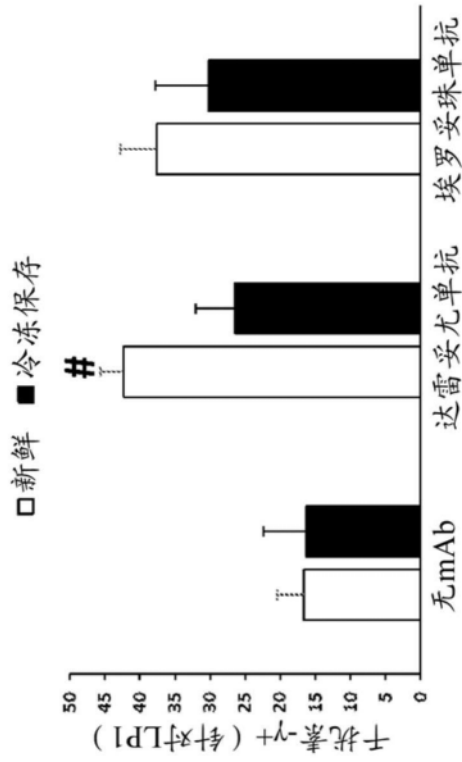


图11E

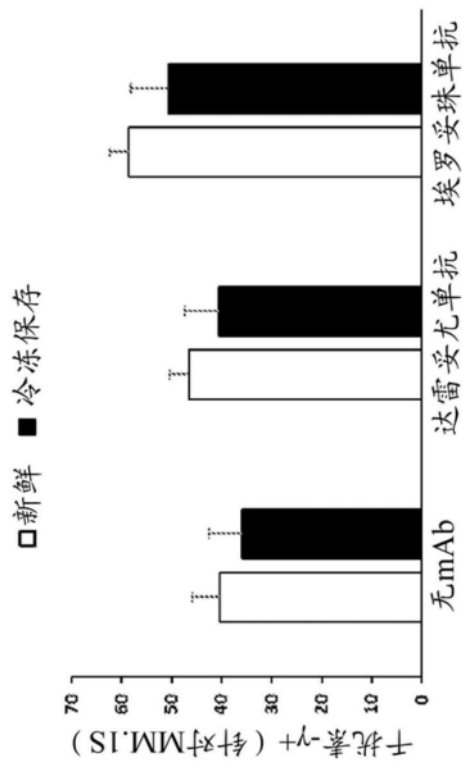


图11F

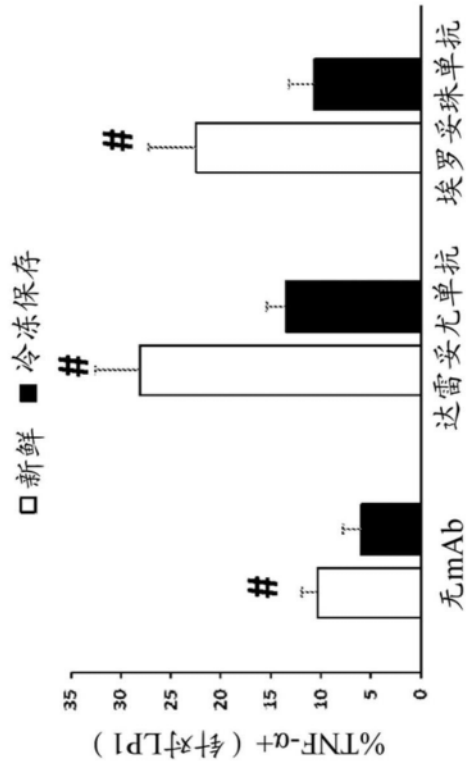


图11G

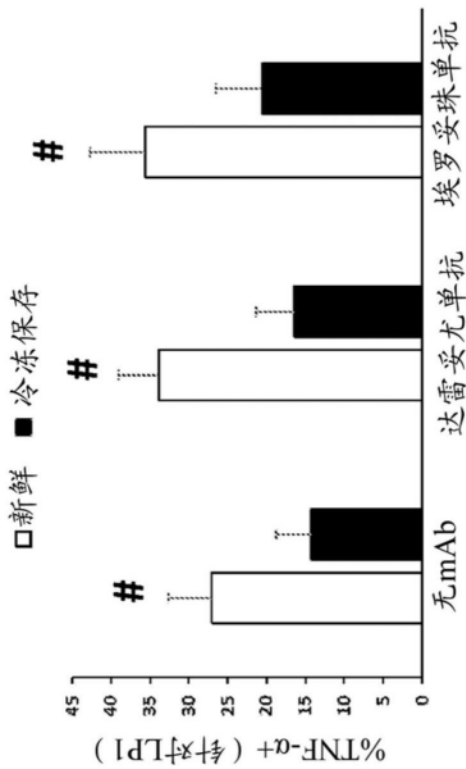


图11H

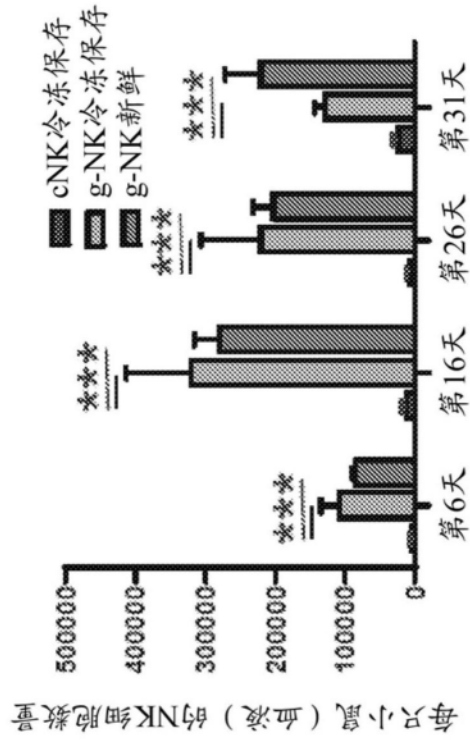


图12A

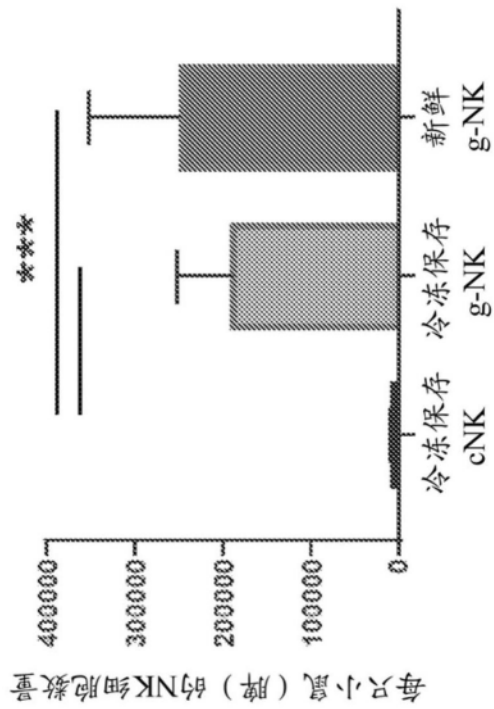


图12B

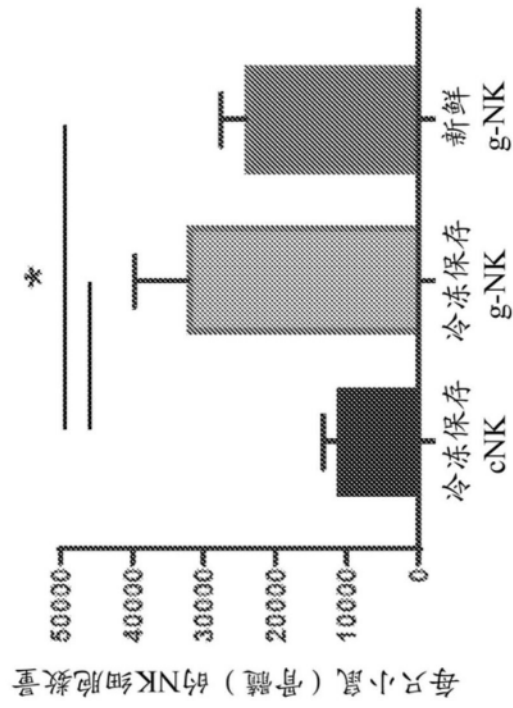


图12C

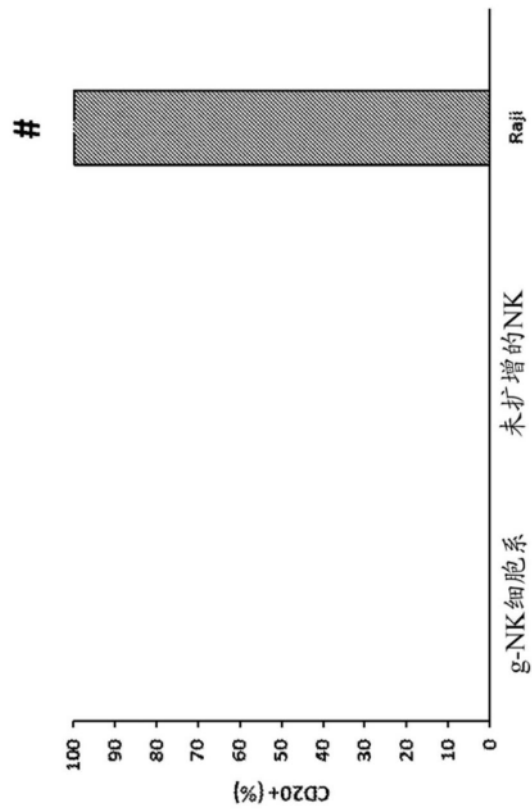


图13A

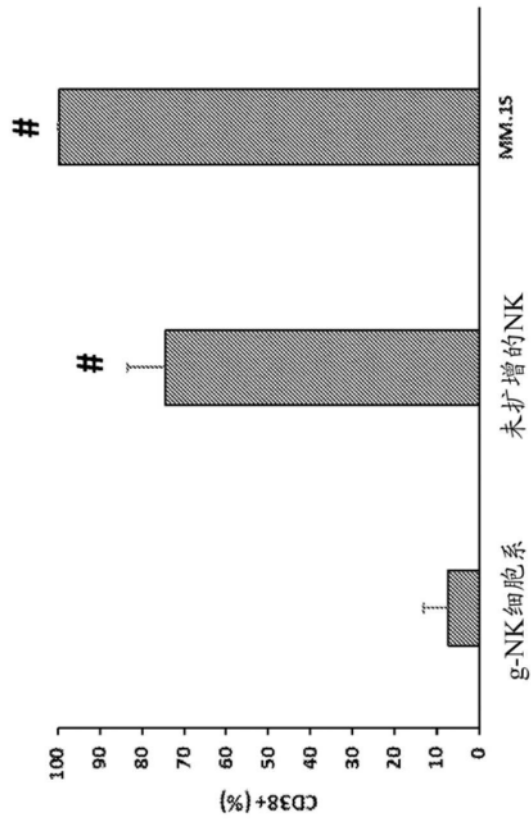


图13B

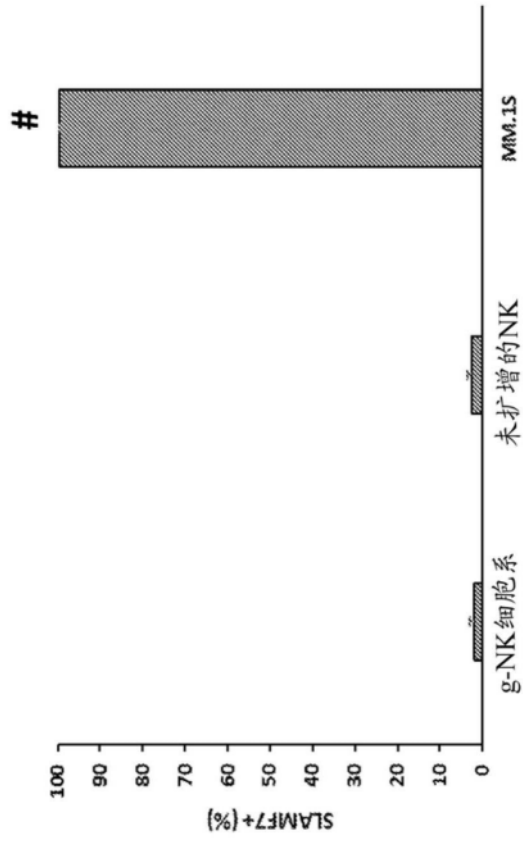


图13C

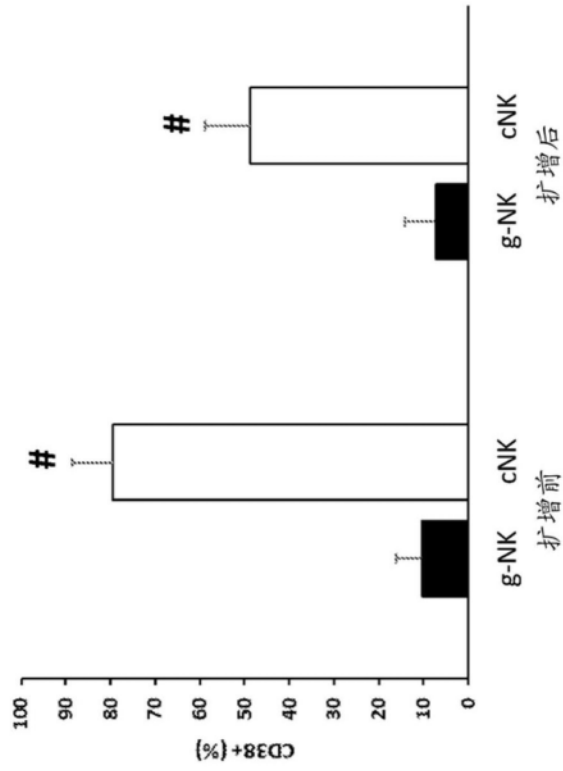


图13D

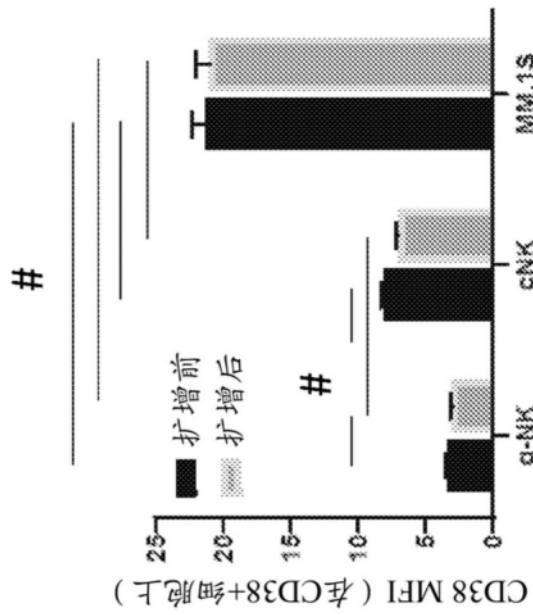


图13E

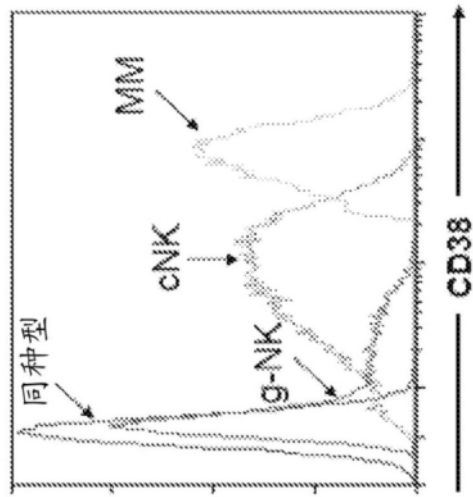


图13F

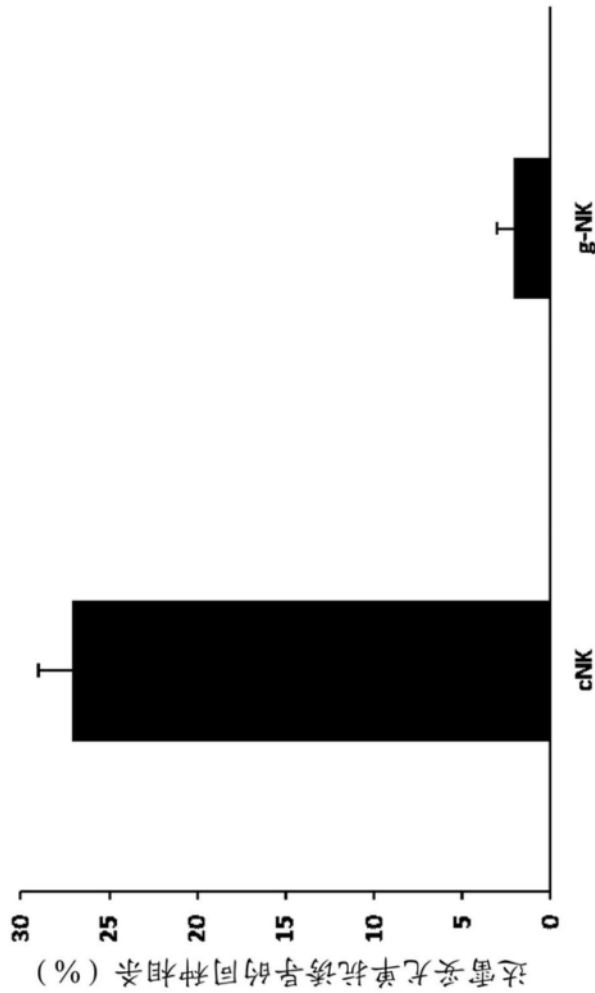


图13G

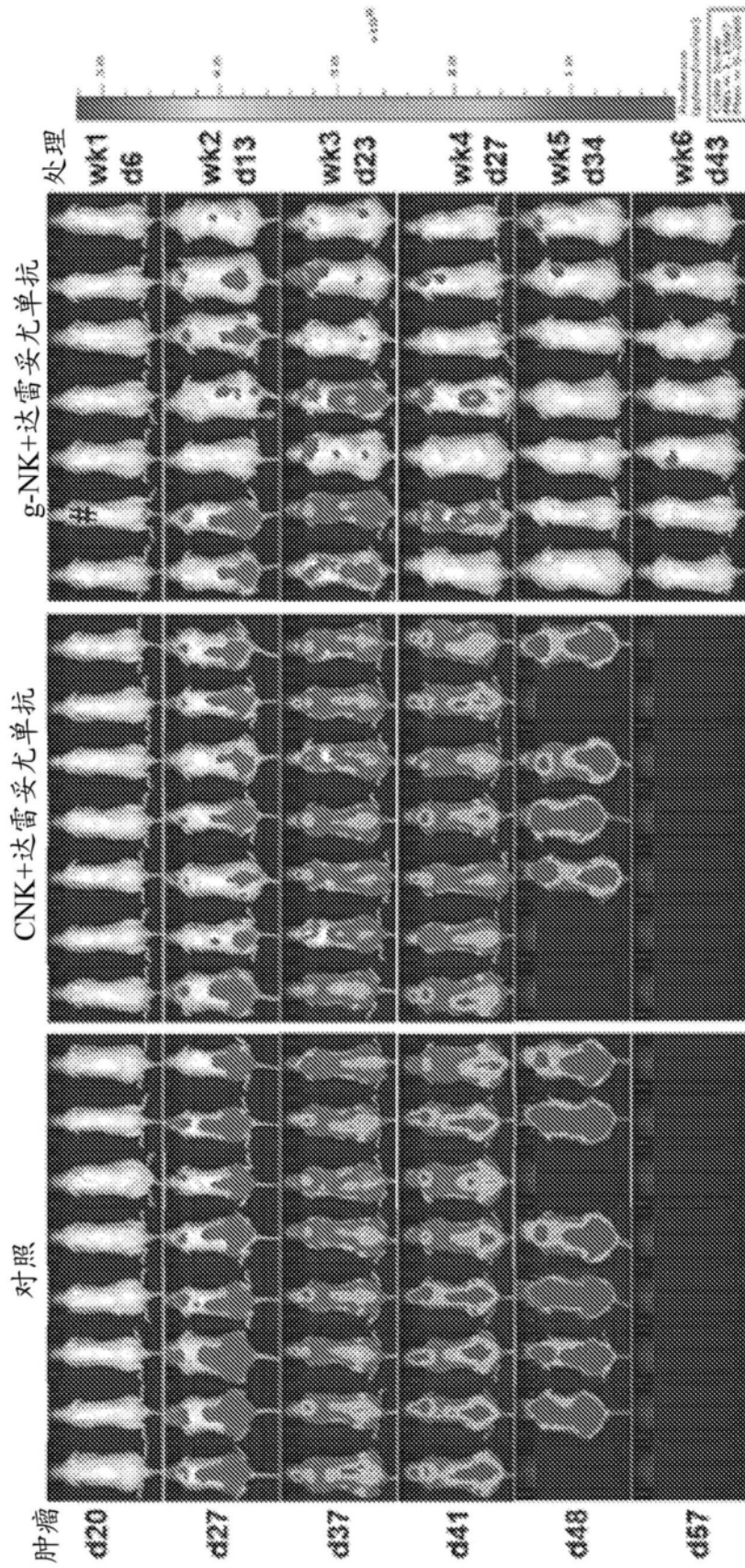


图14A

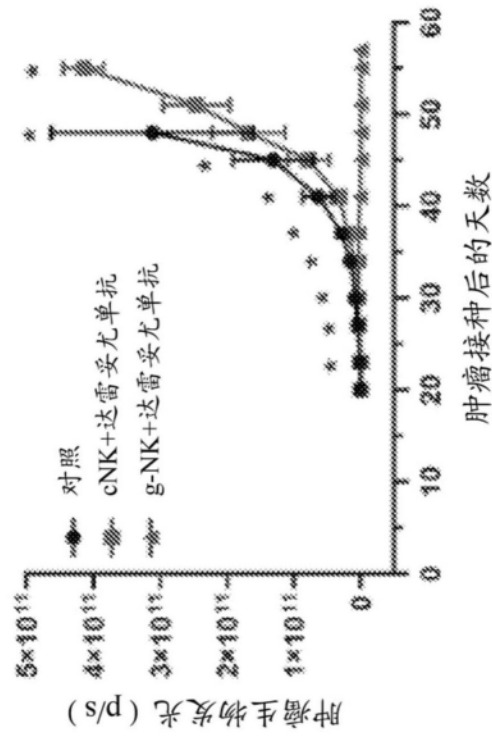


图14B

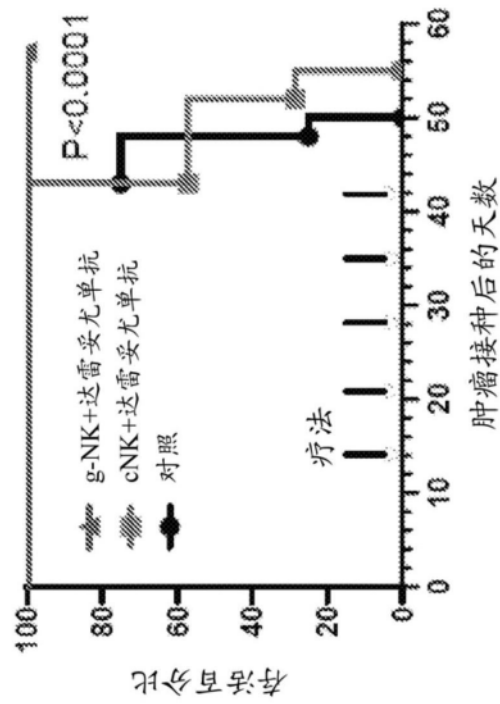


图14C

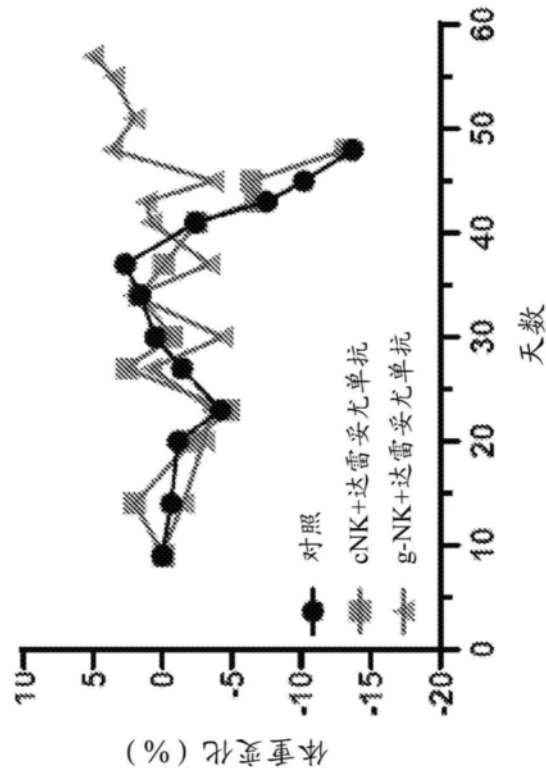


图14D

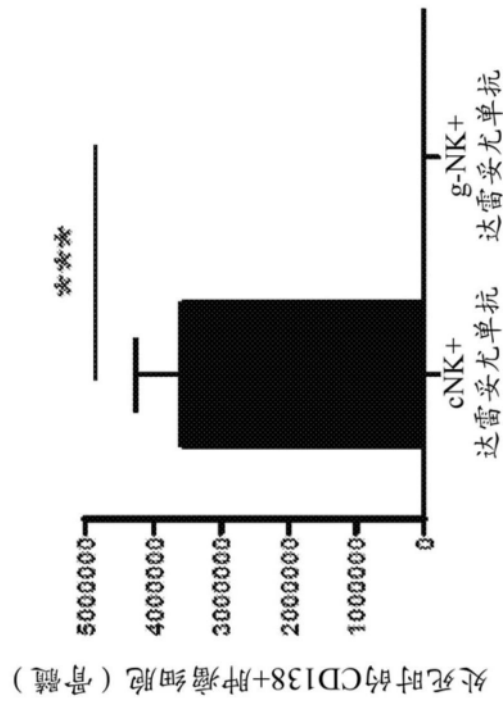


图14E

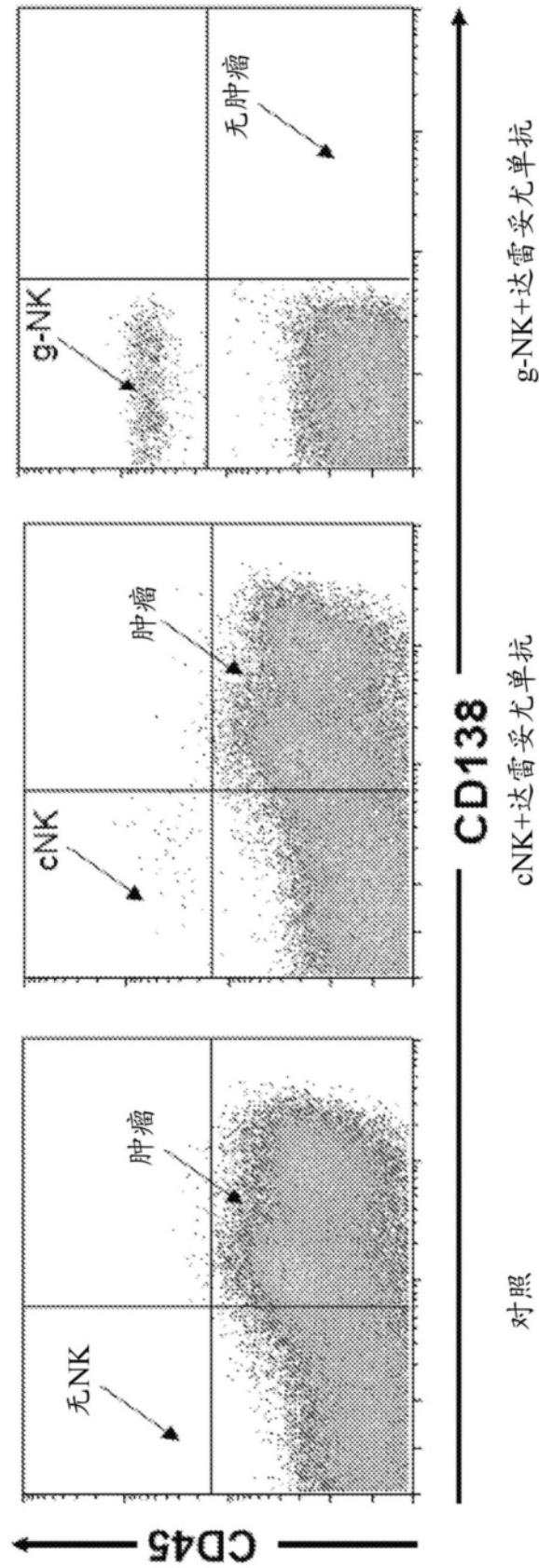


图14F

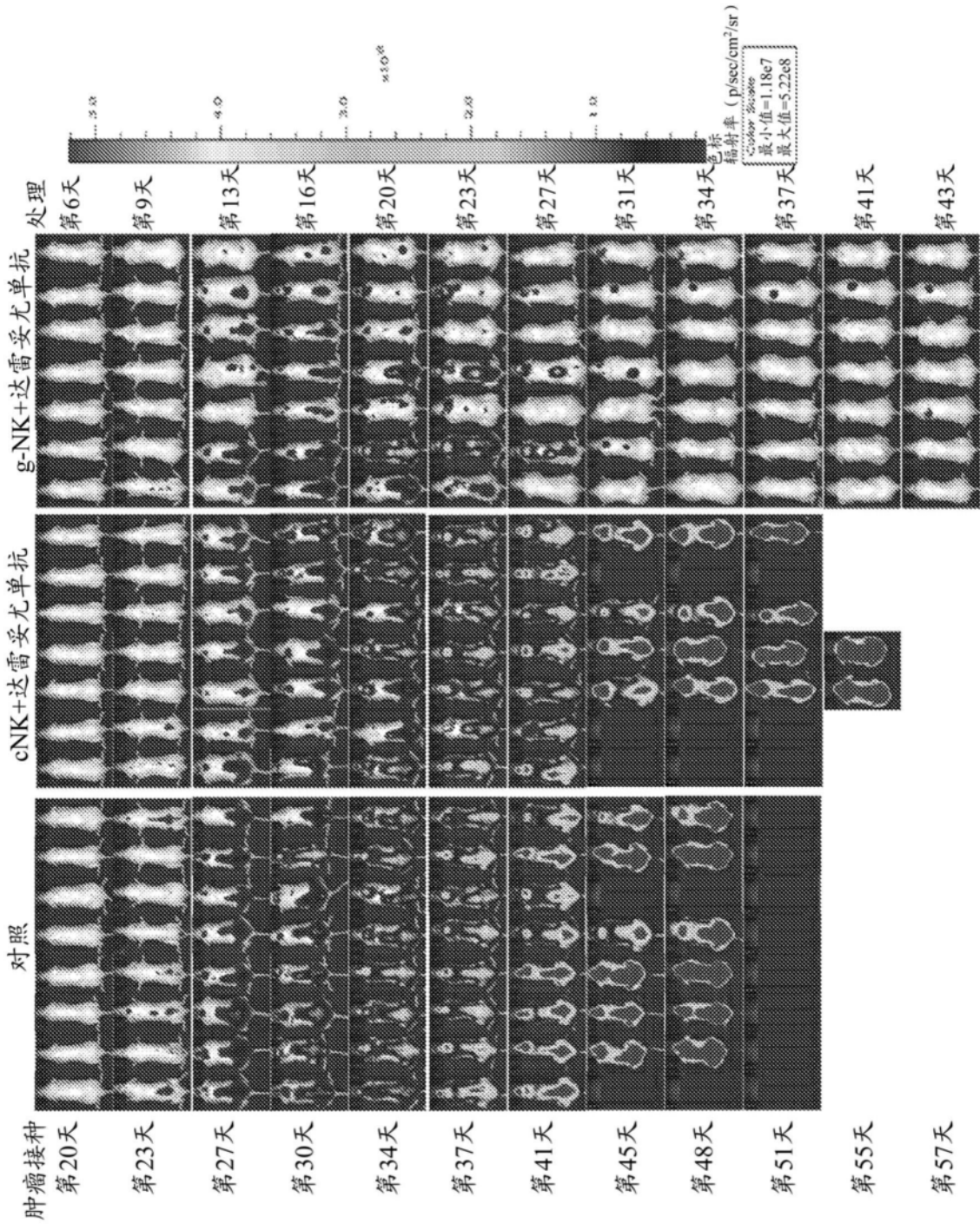


图14G

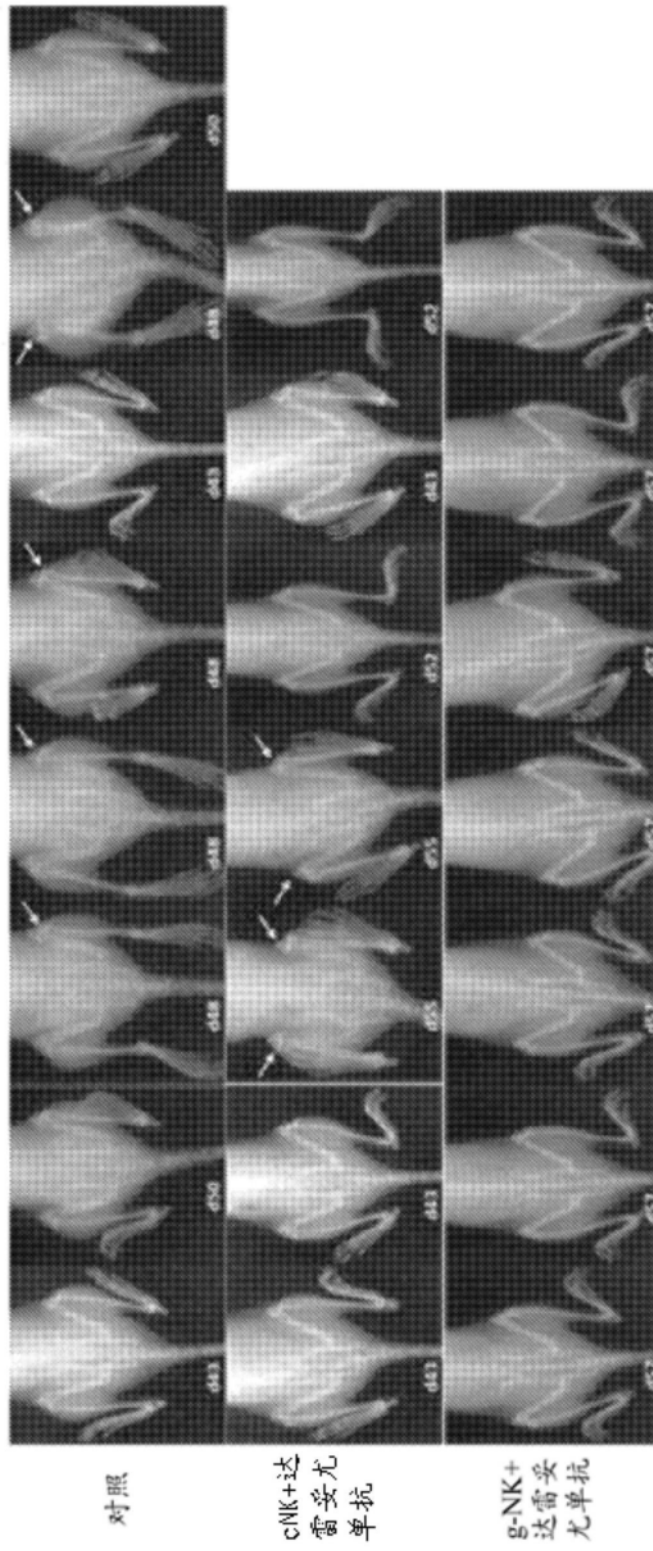


图14H

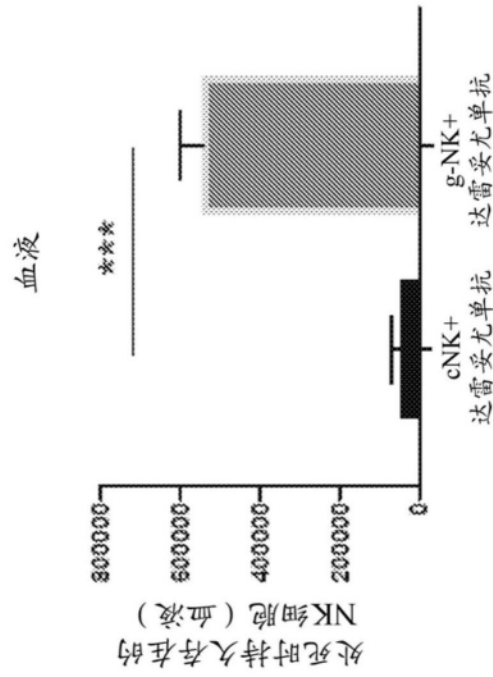


图15A

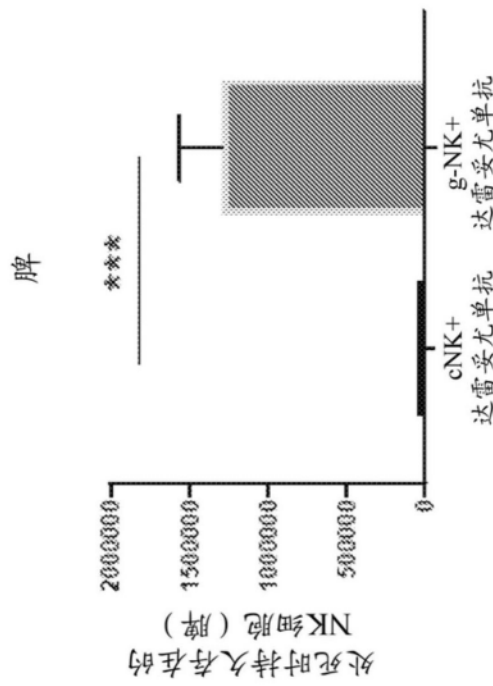


图15B

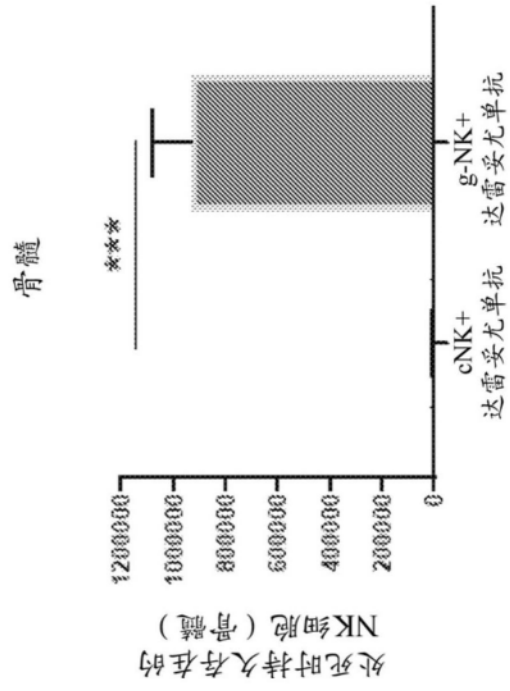


图15C

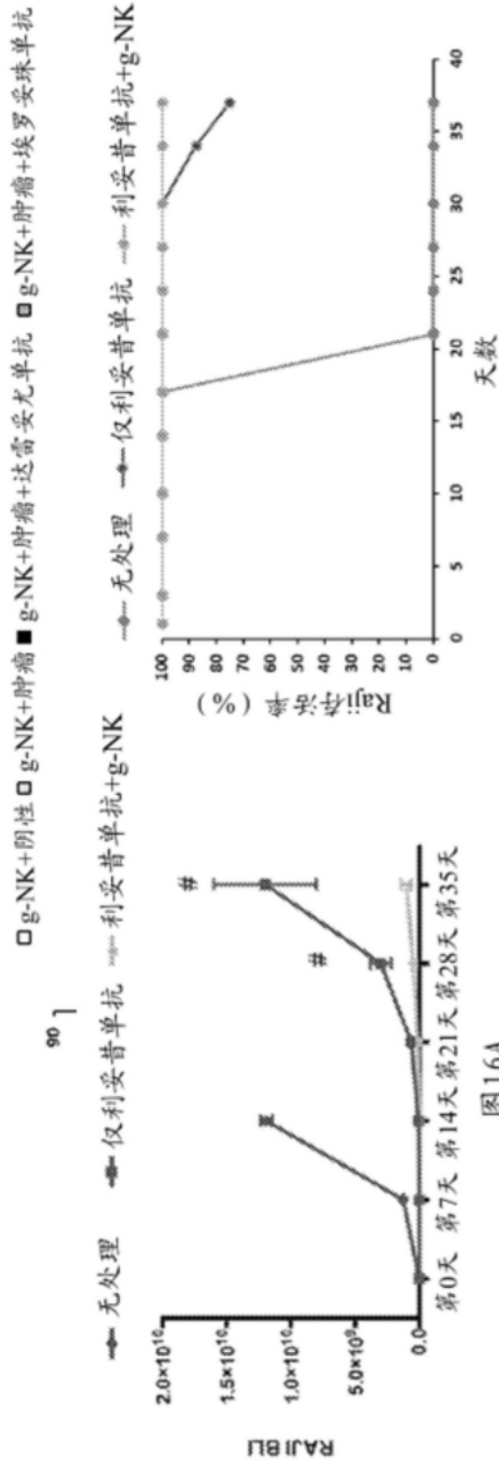


图16A

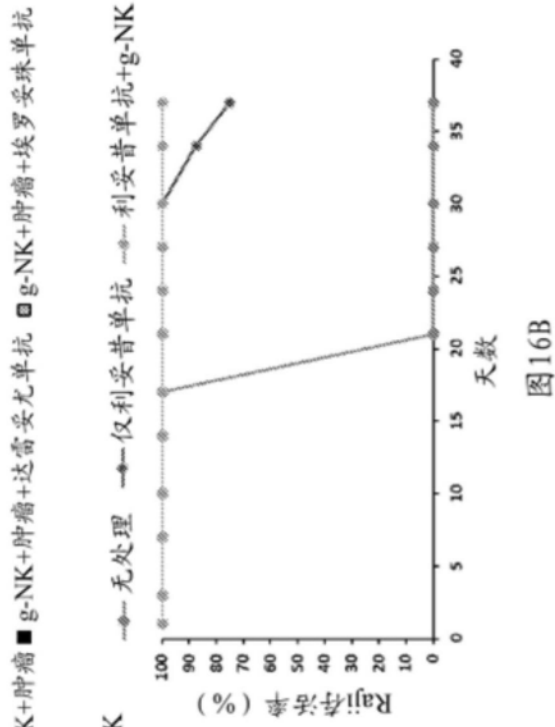


图16B

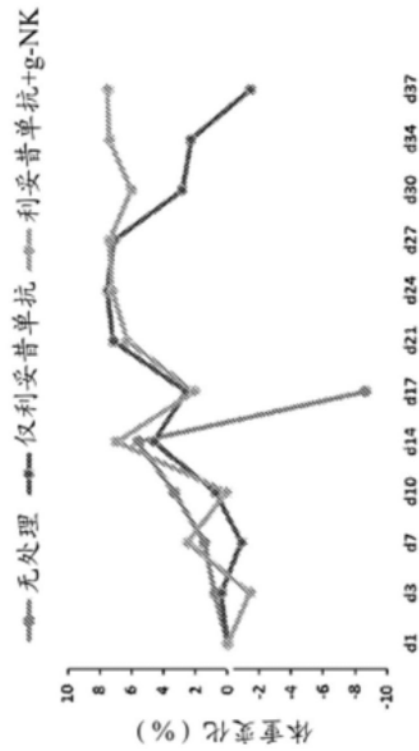


图16C