



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120051297 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 27

(21) 申请号 202380062746.2

(22) 申请日 2023.06.30

(30) 优先权数据

63/357,637 2022.06.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.02.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/069555 2023.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/007020 EN 2024.01.04

(71) 申请人 因达普塔治疗公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 A·比格利 R·西科尔斯基

M·W·弗罗利希

(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 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书9页 说明书159页

序列表(电子公布) 附图78页

(54) 发明名称

工程化自然杀伤(NK)细胞与抗体疗法的组合及相关方法

(57) 摘要

本文提供了治疗方法和用途,其涉及含有缺乏FcR γ 链的表达的NK细胞(g-NK细胞)的组合物与单克隆抗体组合的给药,所述NK细胞用重组嵌合抗原受体(CAR)进行工程化。所提供的方法和用途包括治疗癌症如多发性骨髓瘤或淋巴瘤的方法和用途。

1. 一种诱导溶细胞杀伤靶细胞的方法,所述方法包括使已知或疑似表达第一抗原和第二抗原的靶细胞与以下接触:

(a) 包含缺乏FcR γ 链的表达了自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含与所述第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及

(b) 与所述第二抗原结合的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一和第二抗原是不同的。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一和第二抗原是相同的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是全长抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述CAR和单克隆抗体结合至相同抗原的不同表位。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是血液系统恶性肿瘤细胞。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是B细胞。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自自由CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD79b、CD123、SLAMF7、GPC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。

11. 根据权利要求8-10中任一项所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是多发性骨髓瘤。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自自由CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPC5D和BCMA组成的组。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗BCMACAR,并且所述单克隆抗体是抗CD38抗体。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

15. 根据权利要求8-10中任一项所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是淋巴瘤。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

17. 根据权利要求1-10和15-16中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原选自自由CD19、CD20、CD22、ROR1、CD30、CD38和CD79b组成的组。

18. 根据权利要求1-10和15-17中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原选自自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。

19. 根据权利要求1-10和15-18中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且所述抗体是抗CD20抗体。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗、奥妥珠单抗和奥法木单抗。

21. 根据权利要求1-10和15-18中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且

所述抗体是抗CD38抗体。

22. 根据权利要求1-10和15-18中任一项所述的方法, 其中所述CAR是抗CD20 CAR, 并且所述抗体是抗CD38抗体。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的方法, 其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗。

24. 根据权利要求8-10中任一项所述的方法, 其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是白血病。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述白血病是急性髓系白血病(AML)。

26. 根据权利要求1-10和24-25中任一项所述的方法, 其中所述第一和第二抗原选自CD123、F1t3、CD70、CD33、CLEC12A、CD38组成的组。

27. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是实体恶性肿瘤细胞。

28. 根据权利要求1-7和27中任一项所述的方法, 其中所述第一和第二抗原选自GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUCI16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 组成的组。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中所述单克隆抗体与来自包含所述g-NK细胞的组合物的细胞分开接触。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的方法, 其中与包含g-NK细胞的所述组合物的接触以及与所述单克隆抗体的接触的至少一部分是同时进行的。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法, 其中与包含g-NK细胞的所述组合物的接触以及与所述单克隆抗体的接触是同时进行的。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法, 其中所述单克隆抗体可分泌自所述g-NK细胞。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的方法, 其中所述接触在受试者体内进行。

34. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法, 所述NK细胞疗法包含一定剂量的包含缺乏FcR γ 链的表达式自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物, 其中所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR), 所述CAR包含与第一抗原结合的细胞外结合结构域, 所述第一抗原由所述癌症的细胞表达; 以及

(b) 向所述受试者施用一定剂量的单克隆抗体, 所述单克隆抗体与第二抗原结合, 所述第二抗原由所述癌症的细胞表达。

35. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法, 所述NK细胞疗法包含一定剂量的组合物, 所述组合物包含缺乏FcR γ 链的表达式自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞), 其中:

所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR), 所述CAR包含细胞外结合结构域, 所述细胞外结合结构域与第一抗原结合, 所述第一抗原由所述癌症的细胞表达; 以及

所述g-NK细胞表达可分泌的单克隆抗体, 所述抗体与第二抗原结合, 所述第二抗原由所述癌症的细胞表达。

36. 根据权利要求34或权利要求35所述的方法, 其中所述第一和第二抗原是不同的。

37. 根据权利要求34或权利要求35所述的方法,其中所述第一和第二抗原是相同的。
38. 根据权利要求34-37中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是全长抗体。
39. 根据权利要求34-38中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。
40. 根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其中所述CAR和单克隆抗体与相同抗原的不同表位结合。
41. 根据权利要求34-40中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原由所述癌症的相同细胞表达。
42. 根据权利要求34-41中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。
43. 根据权利要求34-42中任一项所述的方法,其中所述癌症的细胞是B细胞,并且所述癌症是B细胞癌症。
44. 根据权利要求34-43中任一项的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD79b、CD123、SLAMF7、GPRC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。
45. 根据权利要求34-44中任一项所述的方法,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。
46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述多发性骨髓瘤是复发/难治性多发性骨髓瘤。
47. 根据权利要求34-46中任一项所述的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPRC5D和BCMA组成的组。
48. 根据权利要求34-47中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗BCMACAR,并且所述单克隆抗体是抗CD38抗体。
49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗。
50. 根据权利要求34-44中任一项所述的方法,其中所述癌症是淋巴瘤。
51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。
52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述NHL是复发/难治性多发性NHL。
53. 根据权利要求34-44和50-52中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原选自CD19、CD20、CD22、ROR1、CD30、CD38和CD79b组成的组。
54. 根据权利要求34-44和50-53中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原选自CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。
55. 根据权利要求34-44和50-54中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且所述单克隆抗体是抗CD20抗体。
56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗、奥妥珠单抗和奥法木单抗。
57. 根据权利要求34-44和50-54中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且所述抗体是抗CD38抗体。
58. 根据权利要求34-44和50-54中任一项所述的方法,其中所述CAR是抗CD20 CAR,并且所述抗体是抗CD38抗体。
59. 根据权利要求57或权利要求58所述的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗。

60. 根据权利要求34-44中任一项所述的方法,其中所述癌症是白血病。
61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述白血病是急性髓系白血病(AML)。
62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述AML是复发/难治性AML。
63. 根据权利要求34-44和60-62中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原选自由CD123、Flt3、CD70、CD33、CLEC12A、CD38组成的组。
64. 根据权利要求34-41中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体恶性肿瘤。
65. 根据权利要求34-41和64中任一项所述的方法,其中所述第一和第二抗原是GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUC116eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 。
66. 根据权利要求34-65中任一项所述的方法,其中所述一定剂量的g-NK细胞的组合物包含多个数量的剂量。
67. 根据权利要求34-66中任一项所述的方法,其中所述NK细胞疗法包括施用1-8个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物。
68. 根据权利要求34-67中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物每周施用一次。
69. 根据权利要求34-68中任一项所述的方法,其中所述NK细胞疗法在14天周期内以两个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物施用,其中所述14天周期重复一至三次。
70. 根据权利要求34-68中任一项所述的方法,其中所述NK细胞疗法在21天周期内施用以两个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物施用,其中所述21天周期重复一至三次。
71. 根据权利要求34-70中任一项所述的方法,其中:
在施用所述一定剂量的g-NK细胞之前,所述受试者已接受淋巴清除疗法;或者
所述方法还包括在施用所述g-NK细胞之前向所述受试者施用淋巴清除疗法。
72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述一定剂量的g-NK细胞的施用在所述淋巴清除疗法开始后两周内或两周时或约两周时开始。
73. 根据权利要求71或权利要求72所述的方法,其中一定剂量的g-NK细胞的施用在所述淋巴清除疗法开始后7天内或7天时或约7天时开始。
74. 根据权利要求69或权利要求70所述的方法,其中在重复随后的周期之前,向所述受试者施用淋巴清除疗法。
75. 根据权利要求71-74中任一项所述的方法,其中所述淋巴清除疗法包括氟达拉滨和/或环磷酰胺。
76. 根据权利要求71-74中任一项所述的方法,其中所述淋巴清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。
77. 根据权利要求71-76中任一项所述的方法,其中所述淋巴清除包括施用为或约20-40mg/m²受试者体表面积 of 氟达拉滨,任选地为或约30mg/m²,每天一次,持续2-4天;和/或为或约200-400mg/m²受试者体表面积的环磷酰胺,任选地为或约300mg/m²,每天一次,持续2-4天。
78. 根据权利要求71-77中任一项所述的方法,其中所述淋巴清除疗法包括施用为或约30mg/m²受试者体表面积的氟达拉滨,每天一次,以及为或约300mg/m²受试者体表面积的环

磷酸胺,每天一次,各持续2-4天,任选地3天。

79.根据权利要求34和36-78中任一项所述的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的施用是在所述NK细胞疗法的施用前一个月内开始的。

80.根据权利要求34和36-79中任一项所述的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的施用是在所述NK细胞疗法的施用前三周内开始的。

81.根据权利要求34和36-80中任一项所述的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的施用是在所述NK细胞疗法的施用之前两周内开始的。

82.根据权利要求34和36-81中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是静脉内施用的。

83.根据权利要求34和36-81中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是皮下施用的。

84.根据权利要求83所述的方法,其中负荷剂量的所述单克隆抗体是在皮下施用之前静脉内施用的。

85.根据权利要求34和36-84中任一项所述的方法,其中所述一定剂量的单克隆抗体包含多个数量的剂量。

86.根据权利要求34和36-85中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是按每四周一次、每三周一次、每两周一次、每周一次或每周两次施用的。

87.根据权利要求34和36-86中任一项所述的方法,其中每个剂量的所述单克隆抗体每周施用一次。

88.根据权利要求34和36-87中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体以4至16个剂量施用,任选地为或约4个剂量或为或约8个剂量。

89.根据权利要求1-88中任一项所述的方法,其中所述CAR包含1)与所述第一抗原结合的抗原结合结构域;2)间隔子;3)跨膜区;以及4)细胞内信号传导结构域。

90.根据权利要求89所述的方法,其中所述抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。

91.根据权利要求89或权利要求90所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40中的一个或多个信号传导结构域。

92.根据权利要求89或权利要求90所述的工程化NK细胞,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40中的两个或更多个信号传导结构域。

93.根据权利要求89-92中任一项所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含含有CD3 ζ 的信号传导结构域的初级信号传导结构域。

94.根据权利要求93所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域还包含共刺激信号传导结构域,任选地其中所述共刺激信号传导结构域是CD28或4-1BB的信号传导结构域。

95.根据权利要求1-94中任一项所述的方法,其中编码所述CAR的异源核酸被稳定地整合至所述细胞的基因组中。

96.根据权利要求1-94中任一项所述的方法,其中编码所述CAR的异源核酸是瞬时表达的。

97.根据权利要求1-96中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞还包含编码免疫调节蛋白的异源核酸。

98.根据权利要求97所述的方法,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子。

99. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述细胞因子可分泌自所述g-NK细胞。
100. 根据权利要求99所述的方法, 其中所述可分泌的细胞因子是IL-2或其生物部分; IL-15或其生物部分; 或IL-21或其生物部分; 或其组合。
101. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述细胞因子是膜结合的。
102. 根据权利要求101所述的方法, 其中所述膜结合的细胞因子是膜结合的IL-2(mbIL-2); 膜结合的IL-15(mbIL-15); 膜结合的IL-21(mbIL-21); 或其组合。
103. 根据权利要求97-102中任一项所述的方法, 其中编码所述免疫调节剂的异源核酸被稳定地整合至所述细胞的基因组中。
104. 根据权利要求97-102中任一项所述的方法, 其中编码所述免疫调节剂的异源核酸是瞬时表达的。
105. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法, 其还包括施用外源性细胞因子以促进所述g-NK细胞在所述受试者体内的扩增或持续存在, 任选地其中所述外源性细胞因子是或包含IL-15。
106. 根据权利要求1-105中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞中的FcR γ 链是不可通过免疫印迹检测到的。
107. 根据权利要求1-106中任一项所述的方法, 其中在所述g-NK细胞组合物的细胞中, 大于为或约60%的细胞是g-NK细胞, 大于为或约70%的细胞是g-NK细胞, 大于为或约80%的细胞是g-NK细胞, 大于为或约90%的细胞是g-NK细胞, 或大于为或约95%的细胞是g-NK细胞。
108. 根据权利要求1-107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约50%的细胞是FcR γ 缺乏的 (FcR $\gamma^{\text{阴性}}$) NK细胞 (g-NK), 其中大于为或约70%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性, 并且大于为或约70%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性。
109. 根据权利要求107或权利要求108所述的方法, 其中 (i) 大于为或约80%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性, 并且大于为或约80%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性, (ii) 大于为或约90%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性, 并且大于为或约90%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性, 或 (iii) 大于为或约95%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性, 并且大于为或约95%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性。
110. 根据权利要求108或权利要求109所述的方法, 其中:
- 在所述对于穿孔素呈阳性的细胞中, 所述细胞表达的如通过胞内流式细胞仪测量的穿孔素平均水平, 根据平均荧光强度 (MFI), 是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素的平均水平的至少为或约两倍; 和/或
- 在所述对于颗粒酶B呈阳性的细胞中, 所述细胞表达的如通过胞内流式细胞仪测量的颗粒酶B的平均水平, 根据平均荧光强度 (MFI), 是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少为或约两倍。
111. 根据权利要求1-110中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞组合物中大于10%的细胞能够对肿瘤靶细胞进行脱颗粒, 任选地如通过CD107a表达来测量的, 任选地其中在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量脱颗粒。
112. 根据权利要求1-111中任一项所述的方法, 其中, 在存在表达靶抗原的细胞 (靶细胞) 和针对靶抗原的抗体 (抗靶标抗体) 的情况下, 在所述g-NK细胞组合物中的细胞中, 大于

为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%的细胞表现出脱颗粒,任选地如通过CD107a表达来测量的。

113.根据权利要求1-112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,其中干扰素 γ 或TNF- α 是在没有针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

114.根据权利要求1-113中任一项所述的方法,其中,在存在表达靶抗原(靶细胞)的细胞和针对靶抗原的抗体的情况下,在所述g-NK细胞组合物中的细胞中,大于为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%产生效应细胞因子。

115.根据权利要求114所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

116.根据权利要求114或权利要求115所述的方法,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

117.根据权利要求1-116中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞组合物已通过用辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD56+细胞的体外扩增产生的,其中所述CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD56+细胞从供体受试者的生物样品中富集。

118.根据权利要求117所述的方法,其中所述供体受试者是CMV血清阳性。

119.根据权利要求117或权利要求118所述的方法,其中所述供体受试者具有CD16158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样品来自针对CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人类受试者。

120.根据权利要求117-119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品中至少为或约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性),并且所述外周血样品中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低NKG2A(NKG2A阴性)。

121.根据权利要求117-120中任一项所述的方法,其中所述辐照的饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类。

122.根据权利要求117-121中任一项所述的方法,其中所述辐照的饲养细胞是221.AEH细胞。

123.根据权利要求117-122中任一项所述的方法,其中所述培养是在存在两种或更多种重组细胞因子的情况下进行的,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-2,并且至少一种重组细胞因子是IL-21。

124.根据权利要求123所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。

125.根据权利要求123所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

126.根据权利要求1-116中任一项所述的方法,其中所述g-NK细胞经基因工程化以敲除编码所述FcR γ 链的基因。

127.根据权利要求126所述的方法,其中所述敲除是引入所述基因的基因破坏,其中所述基因破坏导致在所述基因中的缺失、插入或突变。

128.根据权利要求126或权利要求127所述的方法,其中编码FcR γ 链的两个等位基因在所述工程化细胞中被破坏。

129.根据权利要求126-128中任一项所述的方法,其中所述基因破坏是通过核酸内切酶。

130.根据权利要求129所述的方法,其中所述核酸内切酶是与引导RNA组合的TAL核酸

酶、巨核酸酶、锌指核酸酶、Argonaute核酸酶或CRISPR酶。

131. 根据权利要求130所述的方法, 其中所述核酸内切酶是与引导RNA组合的CRISPR/Cas9。

132. 根据权利要求126-131中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞还包含编码异源CD16的核酸。

133. 根据权利要求132所述的方法, 其中所述异源CD16包含CD16激活性突变, 其中所述突变导致对IgG1的亲合力更高。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中所述异源CD16包含158V突变。

135. 根据权利要求126-134中任一项所述的方法, 其中所述工程化g-NK细胞来源于从人类受试者中获得的原代细胞。

136. 根据权利要求1-135中任一项所述的方法, 其中所述g-NK细胞组合物在不含血清的冷冻保存培养基中配制, 所述冷冻保存培养基包含冷冻保护剂, 任选地其中所述冷冻保护剂为DMSO, 且所述冷冻保存培养基为5%至10%DMSO(v/v)。

137. 根据权利要求1-136中任一项所述的方法, 其中每个剂量的g-NK细胞为或约为或约 1×10^8 个细胞至为或约 50×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物, 任选地其中每个剂量的g-NK细胞为或约为 5×10^8 个细胞的g-NK细胞组合物, 为或约为 5×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物, 或为或约为 10×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物。

138. 根据权利要求34-137中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人类受试者。

139. 根据权利要求1-138中任一项所述的方法, 其中所述组合物中的NK细胞与受试者是同种异体的。

140. 一种工程化自然杀伤(NK)细胞, 其中所述NK细胞缺乏FcR γ 链的表达(g-NK细胞), 其中所述g-NK细胞包含:

编码嵌合抗原受体(CAR)的异源核酸, 所述CAR包含与所述第一抗原结合的细胞外结合结构域; 以及

编码与第二抗原结合的可分泌的单克隆抗体的异源核酸。

141. 根据权利要求140所述的工程化NK细胞, 其中所述第一和第二抗原是不同的。

142. 根据权利要求141所述的工程化NK细胞, 其中所述第一和第二抗原是相同的。

143. 根据权利要求140-142中任一项所述的工程化NK细胞, 其中所述单克隆抗体是全长抗体。

144. 根据权利要求140-143中任一项所述的工程化NK细胞, 其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

145. 根据权利要求140-144中任一项所述的工程化NK细胞, 其中所述CAR和所述单克隆抗体结合至相同抗原的不同表位。

146. 根据权利要求140-145中任一项所述的工程化NK细胞, 其中所述第一和第二抗原由相同的靶细胞表达。

147. 根据权利要求146中所述的工程化NK细胞, 其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

148. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求140-147中任一项所述的工程化NK细胞和药学上可接受的载体。

149. 根据权利要求148所述的药物组合物, 其包含冷冻保护剂。

150. 根据权利要求148或权利要求149所述的药物组合物,其中所述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。

151. 根据权利要求149或权利要求150所述的药物组合物,其中所述冷冻保护剂为DMSO,并且所述冷冻保存培养基为5%至10%的DMSO(v/v)。

152. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用根据权利要求148-151中任一项所述的药物组合物。

工程化自然杀伤(NK)细胞与抗体疗法的组合及相关方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年6月30日提交的名称为“COMBINATION OF ENGINEERED NATURAL KILLER(NK) CELLS AND ANTIBODY THERAPY AND RELATED METHODS”的美国临时申请号63/357,637的优先权,其内容以引用的方式以其整体并入本文。

通过引用并入序列表

[0002] 本申请随附以电子格式提交的序列表。该序列表以名称为“776032001440SeqList.xml”的文件提供,创建于2023年6月30日,大小为125,042字节。该序列表电子格式中的信息以引用方式以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容提供了治疗方法和用途,其涉及给药含有缺乏FcR γ 链的表达的NK细胞(g-NK细胞)的组合物与单克隆抗体组合,所述NK细胞用重组嵌合抗原受体(CAR)进行工程化。本公开的实施方案包括治疗癌症诸如多发性骨髓瘤或淋巴瘤的方法和用途。

背景技术

[0004] 基于抗体的疗法已被广泛用于治疗癌症和其他疾病。对抗体疗法的应答通常集中在这些抗体对肿瘤细胞的直接抑制性作用上(如,抑制生长因子受体并随后诱导细胞凋亡),但这些抗体的体内效果更为复杂,并涉及宿主免疫系统。自然杀伤(NK)细胞是免疫效应细胞,其在Fc受体(CD16;Fc γ RIII)与结合至携带抗原的细胞的抗体的Fc部分结合时,介导抗体依赖性细胞的细胞毒性。NK细胞,包括其特定的特化亚群,能够在治疗性方法中使用,包括用于改善对抗体疗法的应答。涉及NK细胞的治疗用途需要改进的方法。本文提供的实施方案可以满足此类需求。

发明内容

[0005] 在一些方面,本文提供了诱导溶细胞杀伤靶细胞的方法,所述方法包括使已知或疑似表达第一抗原和第二抗原的靶细胞与以下接触:(a)包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含与第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及(b)与第二抗原结合的单克隆抗体。在任一前述实施方案中,第一和第二抗原可以是不同的。在任一前述实施方案中,第一和第二抗原可以是相同的。在任一前述实施方案中,单克隆抗体可以是全长抗体。在任一前述实施方案中,单克隆抗体可以是IgG1抗体。在任一前述实施方案中,CAR和单克隆抗体可以与相同抗原的不同表位结合。

[0006] 在任一前述实施方案中,靶细胞可以是肿瘤细胞。在任一前述实施方案中,肿瘤细胞可以是血液系统恶性肿瘤细胞。在任一前述实施方案中,靶细胞可以是B细胞。在任一前述实施方案中,第一抗原和第二抗原可以选自由CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD79b、CD123、SLAMF7、GPCR5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原

组成的组。

[0007] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤可以是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原选自由CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPC5D和BCMA组成的组。在一些实施方案中,CAR可以是抗BCMA CAR,并且单克隆抗体可以是抗CD38抗体。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗(daratumumab)或伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

[0008] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤可以是淋巴瘤。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,第一和第二抗原可以选自由CD19、CD20、CD22、ROR1、CD30、CD38和CD79b组成的组。在一些实施方案中,第一和第二抗原可以选自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。在一些实施方案中,CAR可以是抗CD19 CAR,并且抗体可以是抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是利妥昔单抗(rituximab)、奥妥珠单抗(obinutuzumab)或奥法木单抗(ofatumumab)。

[0009] 在一些实施方案中,CAR可以是抗CD19 CAR,并且抗体是抗CD38抗体。在一些实施方案中,CAR可以是抗CD20 CAR,并且抗体是抗CD38抗体。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗(daratumumab)或伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

[0010] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤可以是白血病。在一些实施方案中,白血病可以是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,第一和第二抗原可以选自由CD123、Flt3、CD70、CD33、CLEC12A和CD38组成的组。

[0011] 在一些实施方案中,肿瘤细胞可以是实体恶性肿瘤的细胞。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原可以选自由GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUC16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 组成的组。

[0012] 在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以与来自包含g-NK细胞的组合物的细胞分开接触。在一些实施方案中,与包含g-NK细胞的组合物的接触以及与单克隆抗体的接触的至少一部分可以是同时进行的。在一些实施方案中,与包含g-NK细胞的组合物的接触可以同与单克隆抗体的接触同时进行。

[0013] 在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以是可从g-NK细胞中分泌的。

[0014] 在任一前述实施方案的一些中,所述接触可以在受试者的体内进行。

[0015] 在一些方面,本文提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法可以包括:(a)向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述疗法包含一定剂量的包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含与由癌症细胞表达的第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及(b)向受试者施用一定剂量的单克隆抗体,所述单克隆抗体与由癌症细胞表达的第二抗原结合。

[0016] 在一些方面,本文提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法可以包括向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述NK细胞疗法包括一定剂量的组合物,所述组合物包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞),其中:g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域与由癌症细胞表达的第一抗原结合;并且g-NK细胞表达可分泌的单克隆抗体,所述单克隆抗体与由癌症细胞表达的第二抗原结合。

[0017] 在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以是不同的。在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以是相同的。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体是全长抗体。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以是IgG1抗体。在任一前述实施方案的一些中,CAR和单克隆抗体可以结合至相同抗原的不同表位。在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以由相同的癌症细胞表达。

[0018] 在任一前述实施方案的一些中,癌症是血液系统恶性肿瘤。在任一前述实施方案的一些中,癌症细胞是B细胞,并且癌症是B细胞癌症。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原可以选自由CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD79b、CD123、SLAMF7、GPRC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。

[0019] 在一些实施方案中,癌症可以是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤可以是复发/难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原可以选自由CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPRC5D和BCMA组成的组。在一些实施方案中,CAR可以是抗BMCA CAR,并且单克隆抗体可以是抗CD38抗体。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗(daratumumab)或伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

[0020] 在一些实施方案中,癌症可以是淋巴瘤。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,NHL可以是复发/难治性多发性NHL。在一些实施方案中,第一和第二抗原选自由CD19、CD20、CD22、ROR1、CD30、CD38和CD79b组成的组。在一些实施方案中,第一和第二抗原可以选自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。在一些实施方案中,CAR可以是抗CD19 CAR,并且抗体可以是抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗CD20抗体可以是利妥昔单抗(rituximab)、奥妥珠单抗(obinutuzumab)或奥法木单抗(ofatumumab)。

[0021] 在一些实施方案中,CAR可以是抗CD19 CAR,并且抗体是抗CD38抗体。在一些实施方案中,CAR可以是抗CD20 CAR,并且抗体是抗CD38抗体。在一些实施方案中,抗CD38抗体可以是达雷妥尤单抗(daratumumab)或伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

[0022] 在一些实施方案中,癌症可以是白血病。在一些实施方案中,白血病可以是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,AML可以是复发/难治性AML。在一些实施方案中,第一和第二抗原可以选自由CD123、Flt3、CD70、CD33、CLECL12A和CD38组成的组。

[0023] 在一些实施方案中,癌症是实体恶性肿瘤。在一些实施方案中,第一和第二抗原可以是GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUCI16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 。

[0024] 在任一前述实施方案的一些中,一定剂量的g-NK细胞组合物可以包含多个数量的剂量。在任一前述实施方案的一些中,NK细胞疗法可以包含1-8个剂量的包含g-NK细胞的组合物的施用。在任一前述实施方案的一些中,每个剂量的g-NK细胞组合物可以每周施用一次。在任一前述实施方案的一些中,NK细胞疗法在14天周期内以两个剂量的包含g-NK细胞的组合物施用,其中所述14天周期可以重复一至三次。在任一前述实施方案的一些中,NK细胞疗法在21天周期内以三个剂量的包含g-NK细胞的组合物施用,其中21天周期可以重复一至三次。

[0025] 在任一前述实施方案的一些中,在施用g-NK细胞剂量之前,受试者已接受淋巴清

除疗法。在任一前述实施方案的一些中,所述方法可以还包括在施用g-NK细胞之前向受试者施用淋巴清除疗法。在任一前述实施方案的一些中,一定剂量的g-NK细胞的施用可以在淋巴清除疗法开始后两周内或为或约两周时开始。在任一前述实施方案的一些中,一定剂量的g-NK细胞的施用在淋巴清除疗法开始后7天内或为或约7天时开始。在任一前述实施方案的一些中,在重复随后的周期之前,受试者可被施用淋巴清除疗法。在任一前述实施方案的一些中,淋巴清除疗法可以包括氟达拉滨(fludarabine)和/或环磷酰胺。在任一前述实施方案的一些中,淋巴清除疗法可以包括施用为或约20-40mg/m²受试者体表面积的氟达拉滨和/或为或约200-400mg/m²受试者体表面积的环磷酰胺。在一些实施方案中,氟达拉滨以为或约30mg/m²施用,每日一次,持续2-4天。在一些实施方案中,环磷酰胺以为或约300mg/m²,每日一次,持续2-4天。在任一前述实施方案的一些中,淋巴清除疗法可以包括施用为或约30mg/m²受试者体表面积的氟达拉滨,每日一次,以及为或约300mg/m²受试者体表面积的环磷酰胺,每日一次,各持续2-4天,任选地3天。

[0026] 在任一前述实施方案的一些中,至少一个剂量的单克隆抗体的施用可以在NK细胞疗法的施用前一个月内开始。在任一前述实施方案的一些中,至少一个剂量的单克隆抗体的施用可以在NK细胞疗法的施用前三周内开始。在任一前述实施方案的一些中,至少一个剂量的单克隆抗体的施用可以在NK细胞疗法的施用前两周内开始。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以静脉内施用。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以皮下施用。在任一前述实施方案的一些中,负载剂量的单克隆抗体可以在皮下施用之前静脉内施用。在任一前述实施方案的一些中,一定剂量的单克隆抗体可以包括多个数量的剂量。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以是每四周一次、每三周一次、每两周一次、每周一次或每周两次施用的。在任一前述实施方案的一些中,每个剂量的单克隆抗体可以每周施用一次。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以以4至16个剂量施用,任选地为或约4个剂量或为或约8个剂量。

[0027] 在任一前述实施方案的一些中,CAR可以包含1)与第一抗原结合的抗原结合结构域;2)间隔子;3)跨膜区;以及4)细胞内信号传导结构域。在任一前述实施方案的一些中,抗原结合结构域可以是单链可变片段(scFv)。在任一前述实施方案的一些中,细胞内信号传导结构域可以包含一个或多个CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40的信号传导结构域。在任一前述实施方案的一些中,细胞内信号传导结构域可以包含两个或更多个CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40的信号传导结构域。在任一前述实施方案的一些中,细胞内信号传导结构域可以包含含有CD3 ζ 的信号传导结构域的初级信号传导结构域。在任一前述实施方案的一些中,其中所述细胞内信号传导结构域可进一步包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号转导结构域是CD28的信号转导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号转导结构域是4-1BB的信号转导结构域。

[0028] 在任一前述实施方案的一些中,编码CAR的异源核酸能够稳定地整合至细胞的基因组中。在任一前述实施方案的一些中,编码CAR的异源核酸可以瞬时表达。在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞可进一步包含编码免疫调节蛋白的异源核酸。在任一前述实施方案的一些中,免疫调节蛋白可以是细胞因子。在任一前述实施方案的一些中,细胞因子可以是可从g-NK细胞分泌的。在任一前述实施方案的一些中,可分泌的细胞因子可以是IL-2或其生物部分;IL-15或其生物部分;或IL-21或其生物部分;或其组合。在任一前述实施方

案的一些中,细胞因子可以是膜结合的。在任一前述实施方案的一些中,膜结合的细胞因子是膜结合的IL-2 (mbIL-2);膜结合的IL-15 (mbIL-15);膜结合的IL-21 (mbIL-21);或其组合。在任一前述实施方案的一些中,编码免疫调节物的异源核酸可以稳定地整合至细胞的基因组中。在任一前述实施方案的一些中,编码免疫调节物的异源核酸可以瞬时表达。

[0029] 在任一前述实施方案的一些中,所述方法可以进一步包括施用外源性细胞因子以促进受试者体内g-NK细胞的扩增或持续性。在一些实施方案中,外源性细胞因子是或包含IL-15。

[0030] 在任一前述实施方案的一些中,其中g-NK细胞中的所述FcR γ 链可能无法通过免疫印迹检测到。

[0031] 在任一前述实施方案的一些中,在g-NK细胞组合物的细胞中,大于为或约60%的细胞是g-NK细胞,大于为或约70%的细胞是g-NK细胞,大于为或约80%的细胞是g-NK细胞,大于为或约90%的细胞是g-NK细胞,或大于为或约95%的细胞是g-NK细胞。在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞组合物中至少为或约50%的细胞是FcR γ 缺失 (FcR $\gamma^{\text{缺失}}$) 的NK细胞 (g-NK),其中大于为或约70%的g-NK细胞可以是穿孔素阳性的,并且大于为或约70%的g-NK细胞可以是颗粒酶B阳性的。在任一前述实施方案的一些中,(i) 大于为或约80%的g-NK细胞可以是穿孔素阳性的,大于为或约80%的g-NK细胞是颗粒酶B阳性的,(ii) 大于为或约90%的g-NK细胞是穿孔素阳性的,大于为或约90%的g-NK细胞可以是颗粒酶B阳性的,或(iii) 大于为或约95%的g-NK细胞可以是穿孔素阳性的,大于为或约95%的g-NK细胞可以是颗粒酶B阳性的。在任一前述实施方案的一些中,在穿孔素阳性的细胞中,细胞可以表达的如通过细胞内流式细胞术来测量的穿孔素的平均水平,根据平均荧光强度(MFI),是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素的平均水平的至少为或约两倍。在任一前述实施方案的一些中,在颗粒酶B阳性的细胞中,细胞可以表达的如通过细胞内流式细胞术来测量的颗粒酶B的平均水平,根据平均荧光强度(MFI),是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少为或约两倍。

[0032] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞组合物中大于10%的细胞可以能够对肿瘤靶细胞进行脱颗粒。在一些实施方案中,能够脱颗粒的g-NK细胞是如通过CD107a表达来测量的。在一些实施方案中,脱颗粒是在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

[0033] 在任一前述实施方案的一些中,在g-NK细胞组合物的细胞中,大于为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%表现出脱颗粒。在一些实施方案中,在存在表达靶抗原(靶细胞)的细胞和定向针对靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的情况下,能够脱颗粒的g-NK细胞通过CD107a表达来测量。在一些实施方案中,能够脱颗粒的g-NK细胞可以通过CD107a表达来测量的。在一些实施方案中,脱颗粒是在存在表达靶抗原(靶细胞)的细胞和定向针对靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的情况下测量的。

[0034] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞组合物中大于10%的细胞可能产生针对肿瘤靶细胞的干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,干扰素- γ 或TNF- α 在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

[0035] 在任一前述实施方案的一些中,在g-NK细胞组合物的细胞中,大于为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%在存在表达靶抗原(靶细胞)的细胞和定向针对靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的情况下,产生效应细胞因子。在任一

前述实施方案的一些中,效应细胞因子可以是IFN- γ 或TNF- α 。在任一前述实施方案的一些中,效应细胞因子可以是IFN- γ 和TNF- α 。

[0036] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞组合物已通过用辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD56+细胞的体外扩增产生,其中CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD55+细胞可以从供体受试者的生物样品中富集。在任一前述实施方案的一些中,供体受试者可以CMV血清阳性的。在任一前述实施方案的一些中,供体受试者可具有CD16 158V/VNK细胞基因型。在任一前述实施方案的一些中,供体受试者可具有CD16158V/FNK细胞基因型。在一些实施方案中,生物样品可以来自针对CD16 158V/VNK细胞基因型选择的人类受试者。在一些实施方案中,生物样品可以来自针对CD16 158V/FNK细胞基因型选择的人类受试者。

[0037] 在任一前述实施方案的一些中,来自供体受试者的外周血样品中至少为或约20%的自然杀伤(NK)细胞可以是对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性)的,外周血样品中至少70%的NK细胞可以是对NKG2A呈阴性的或低NKG2A的(NKG2A阴性)。在任一前述实施方案的一些中,辐照的饲养细胞可以是缺乏HLA I类和HLA II类的。在任一前述实施方案的一些中,辐照的饲养细胞可以是221.AEH细胞。在任一前述实施方案的一些中,所述培养可在两种或更多种重组细胞因子存在的情况下进行,其中至少一种重组细胞因子可以是白介素(IL)-2,并且至少一种重组细胞因子可以是IL-21。在任一前述实施方案的一些中,重组细胞因子可以是IL-21和IL-2。在任一前述实施方案的一些中,重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

[0038] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞可经基因工程化以敲除编码FcR γ 链的基因。在任一前述实施方案的一些中,基因敲除可以是基因的基因破坏的引入,其中基因破坏导致在基因中的缺失、插入或突变。在任一前述实施方案的一些中,编码FcR γ 链的两个等位基因可以在工程化细胞中被破坏。在任一前述实施方案的一些中,基因破坏可以通过核酸内切酶来实现。在任一前述实施方案的一些中,核酸内切酶可以是TAL核酸酶、巨核酸酶、锌指核酸酶、Argonaute核酸酶或CRISPR酶与引导RNA组合。在任一前述实施方案的一些中,其中所述核酸内切酶可以是CRISPR/Cas9与引导RNA组合。

[0039] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞可进一步包含编码异源CD16的核酸。在任一前述实施方案的一些中,异源CD16可包含CD16激活性突变,其中所述突变导致对于IgG1的亲合力更高。在任一前述实施方案的一些中,异源CD16可包含158V突变。在任一前述实施方案的一些中,工程化g-NK细胞可以来源于从人类受试者获得的原代细胞。

[0040] 在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞组合物可以在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中配制。在一些实施方案中,冷冻保护剂可以是DMSO,且冷冻保存培养基可以是5%-10%的DMSO(v/v)。在任一前述实施方案的一些中,g-NK细胞的每个剂量可以从或约从为或约 1×10^8 个细胞至为或约 50×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物。在一些实施方案中,g-NK细胞的每个剂量可以为或可以为约 5×10^8 个细胞的g-NK细胞组合物。在一些实施方案中,g-NK细胞的每个剂量可以为或可以为约 5×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物。在一些实施方案中,g-NK细胞的每个剂量可以为或可以为约 10×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物。在任一前述实施方案的一些中,受试者是人类受试者。在任一前述实施方案的一些中,组合物中的NK细胞是对于受试者可以是同种异体的。

[0041] 在一些方面,提供了一种工程化自然杀伤(NK)细胞,其中所述NK细胞可以是缺乏FcR γ 链(g-NK细胞)的表达的,其中所述g-NK细胞可以包含:编码嵌合抗原受体(CAR)的异

源核酸,所述嵌合抗原受体包含与第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及编码与第二抗原结合的可分泌单克隆抗体的异源核酸。在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以是不同的。在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以是相同的。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以是全长抗体。在任一前述实施方案的一些中,单克隆抗体可以是IgG1抗体。在任一前述实施方案的一些中,CAR和单克隆抗体可以结合至相同抗原的不同表位。在任一前述实施方案的一些中,第一和第二抗原可以由相同的靶细胞表达。在任一前述实施方案中,靶细胞可以是肿瘤细胞。

[0042] 还提供了一种药物组合物,其包含工程化NK细胞的任一种和药学上可接受的载体。在任一前述实施方案的一些中,药物组合物可以包含冷冻保护剂。在任一前述实施方案的一些中,药物组合物可以在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存培养基中配制。在任一前述实施方案的一些中,冷冻保护剂是DMSO。在一些实施方案中,冷冻保存培养基可以是5% - 10%的DMSO(v/v)。

[0043] 本文还提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其包括向患有癌症的受试者施用所述药物组合物。

附图简要说明

[0044] 图1A和图1B描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21的情况下g-NK细胞的扩增。图1A显示了总NK细胞计数。图1B显示了扩增21天时的n倍扩增。

[0045] 图2A和图2B描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21中扩增的g-NK细胞在扩增21天后达雷妥尤单抗(daratumumab)和埃罗妥珠单抗(elotuzumab)介导的细胞毒性活性。图2A显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。图2B显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。

[0046] 图3A和图3D描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21的情况下扩增的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显示了在扩增后13天针对LP1细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。图3B显示了扩增后13天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。图3C显示了扩增后21天针对LP1细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。图3D显示了扩增后21天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。

[0047] 图4A-4D描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21的情况下扩增的g-NK细胞的穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图4A显示了扩增后13天细胞穿孔素和颗粒酶B的表达,以g-NK的百分比表示。图4B显示了扩增后13天总穿孔素和颗粒酶B表达。图4C显示了以g-NK的百分比表示扩增后21天细胞穿孔素和颗粒酶B表达。图4D显示了扩增后21天总穿孔素和颗粒酶B表达。

[0048] 图5A-5D描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21的情况下扩增的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 表达水平。图5A显示了扩增后13天针对LP1细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。图5B显示了扩增后13天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。图5C显示了扩增后21天针对LP1细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。图5D显示了扩增后21天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。

[0049] 图6A-6D描述了在存在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞且NK细胞培养基中含有或不含IL-21的情况下扩增的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显示了扩增后13天针对LP1细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。图6B显示了扩增后13天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。图6C显示了扩增后21天针对LP1细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。图6D显示了扩增后21天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。

[0050] 图7描述了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增15天的NK细胞的g-NK细胞扩增情况。

[0051] 图8A-8J显示了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的g-NK细胞的细胞效应功能。

[0052] 图8A和图8B描述了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的g-NK细胞的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。图8A显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。图8B显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。

[0053] 图8C和图8D描述了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的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显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的脱颗粒水平。图8D显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的脱颗粒水平。

[0054] 图8E和图8F显示了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的g-NK细胞的穿孔素和颗粒酶B的表达的水平。图8E显示了细胞穿孔素和颗粒酶B表达,以g-NK细胞的百分比表示。图8F显示了总穿孔素和颗粒酶B表达量。

[0055] 图8G和图8H描述了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的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 表达水平。图8G显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的干扰素- γ 表达水平。图8H显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的干扰素- γ 表达水平。

[0056] 图8I和图8J描述了在存在多个细胞因子混合物和浓度的情况下扩增的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显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的TNF- α 表达水平。图8J显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的TNF- α 表达水平。

[0057] 图9A和图9B描述了与不含IL-21情况下扩增的g-NK细胞相比,在存在IL-21情况下扩增的g-NK细胞的扩增。图9A显示了扩增之前和之后的g-NK细胞百分比。图9B显示了每1000万NK细胞扩增的g-NK细胞数量。数值为平均值 $\pm$ SE。CD3^{阳性}/CD57^{阳性}+IL-21扩增与不含IL-21的CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增的比较, #p<0.001。CD3^{阳性}/CD57^{阳性}扩增与其他CMV^{阳性}扩增的比较, ^p<0.05。CMV^{阳性}扩增与CMV^{阴性}CD3^{阳性}扩增的比较, *p<0.001。

[0058] 图9C描述了扩增之前和之后的g-NK的比例(占来自CMV+(n=8)和CMV-供体(n=6)的NK细胞总数的百分比)的比较。图9D描述了来自CMV+和CMV-供体的g-NK的n倍扩增率。图9E提供了针对CMV+供体的Fc ϵ R1 γ 与CD56的代表性流式图。图9F提供了针对CMV+和CMV-供体的CD3-/CD56+NK细胞上Fc ϵ R1 γ 表达的代表性直方图。使用独立样品t检验确定扩增之前和之后的CMV+和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, 以及***P<0.001。

[0059] 图9G和图9H描述了与不含IL-21的情况下扩增的g-NK相比,在存在IL-21的情况下扩增的g-NK细胞扩增后14天的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。图9G显

示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。图9H显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的细胞毒性。数值为平均值 $\pm$ SE。 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}+IL-21$ 扩增与不含IL-21的 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}$ 扩增的比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$,以及*** $p<0.001$ 。

[0060] 图9I和图9J描述了与不含IL-21的情况下扩增的g-NK相比,在含IL-21的情况下扩增的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($CD107a^{\text{阳性}}$)。图9I显示了在扩增14天后针对LP1细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。图9J显示了在扩增14天后针对MM.1S细胞系的g-NK细胞脱颗粒水平。数值为平均值 $\pm$ SE。 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}+IL-21$ 扩增与不含IL-21的 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}$ 扩增的比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$,以及*** $p<0.001$ 。

[0061] 图9K和图9L显示了与不含IL-21的情况下扩增的g-NK相比,在存在IL-21的情况下扩增的g-NK细胞中穿孔素和颗粒酶B表达的水平。图9K显示了以NK细胞的百分比表示扩增后14天穿孔素和颗粒酶B表达。图9L显示了在扩增后14天总穿孔素和颗粒酶B表达。数值为平均值 $\pm$ SE。 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}+IL-21$ 扩增与不含IL-21的 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}$ 扩增的比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$,以及*** $p<0.001$ 。

[0062] 图9M描述了与cNK细胞相比,扩增的g-NK细胞中穿孔素(左)和颗粒酶B(右)的基线表达($n=5$)。为了比较g-NK和cNK之间的效应穿孔素和颗粒酶B的表达,使用了独立样品t检验。数值为平均值 $\pm$ SE。与cNK细胞的统计学差异以*** $p<0.001$ 表示。

[0063] 图9N描述了g-NK和cNK细胞中穿孔素和颗粒酶B表达的代表性直方图。

[0064] 图9O和图9P描述了与不含IL-21的情况下扩增的g-NK相比,在存在IL-21的情况下扩增的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 表达水平。图9O显示了扩增后14天针对LP1细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。图9P显示了扩增后14天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。数值为平均值 $\pm$ SE。 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}+IL-21$ 扩增与不含IL-21的 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}$ 扩增的比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$,以及*** $p<0.001$ 。

[0065] 图9Q和图9R描述了与不含IL-21的情况下扩增的g-NK相比,在存在IL-21的情况下扩增的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显示了扩增后14天针对LP1细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。图9R显示了扩增后14天针对MM.1S细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。数值为平均值 $\pm$ SE。 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}+IL-21$ 扩增与不含IL-21的 $CD3^{\text{阴性}}/CD57^{\text{阳性}}$ 扩增的比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$,以及*** $p<0.001$ 。

[0066] 图9S描述了与cNK细胞相比,扩增的g-NK细胞针对在不同供体中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 表达水平。图9T描述了与cNK细胞相比,扩增的g-NK细胞针对在不同供体中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。

[0067] 图10描述了在存在IL-21/抗IL-21复合物的情况下g-NK的扩增($n=4$)。数值为平均值 $\pm$ SE。使用IL-21扩增与使用IL-21/抗IL-21复合物扩增的比较,# $p<0.001$ 。

[0068] 图11A-11H显示了先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜富集的g-NK细胞($n=4$)的NK细胞效应功能比较。数值为平均值 $\pm$ SE。新鲜富集的g-NK细胞与先前冷冻保存的g-NK细胞比较,# $p<0.05$ 。

[0069] 图11A和图11B描述了与新鲜富集的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($CD107a^{\text{阳性}}$)。图11A显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的脱颗粒水平。图11B显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞的脱颗粒水平。

[0070] 图11C和图11D描述了先前冷冻保存的g-NK细胞与新鲜富集的g-NK细胞相比穿孔素和颗粒酶B的表达水平。图11C显示了g-NK细胞的总穿孔素表达。图11D显示了g-NK的总颗粒酶B表达。

[0071] 图11E和图11F描述了与新鲜富集的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 表达水平。图11E显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞的干扰素- γ 表达水平。图11F显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞干扰素- γ 表达水平。

[0072] 图11G和图11H描述了与新鲜富集的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11G显示了针对LP1细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。图11H显示了针对MM.1S细胞系的g-NK细胞TNF- α 表达水平。

[0073] 图12A-12C描述了在输注单剂量的 1×10^7 个扩增的细胞后NSG小鼠中cNK(冷冻保存)和g-NK(冷冻保存的或新鲜)细胞的持久性。图12A显示了输注后第6、16、26和31天采集的外周血中cNK和g-NK细胞的数量。图12B显示了输注后第31天,即牺牲时,脾脏中存在的NK细胞的数量。图12C显示了牺牲时骨髓中存在NK细胞的数量。所有3组均 $N=3$ 。数值为平均值 $\pm$ SE。冷冻保存的cNK细胞与新鲜或冷冻保存的g-NK细胞比较,* $p<0.05$,*** $p<0.001$ 。

[0074] 图13A-13D描述了g-NK和cNK上CD20(利妥昔单抗的靶点)、CD38(达雷妥尤单抗的靶点)和SLAMF7(埃罗妥珠单抗的靶点)的表达。图13A显示了扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和表达CD20的Raji细胞的百分比。图13B显示了扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和表达CD38的MM.1S细胞的百分比。图13C显示了扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{\text{阴性}}/CD56^{\text{阳性}}$)和表达SLAMF7的MM.1S细胞的百分比。图13D显示了扩增之前和之后的表达CD38的cNK和g-NK的百分比。所有组均 $N=3$ 。

[0075] 图13E描述了扩增之前和之后的 $CD38^{\text{阳性}}$ NK细胞的平均荧光强度(MFI) ($n=4$)。图13F提供了描述相对于cNK和MM.1S细胞,g-NK细胞的CD38表达减少的代表性直方图。数值为平均值 $\pm$ SE。g-NK细胞与所有其他细胞的比较,# $p<0.001$ 。图13G描述了扩增的g-NK细胞和cNK细胞的达雷妥尤单抗诱导的同种相杀的比较。

[0076] 图14A-F显示了cNK和达雷妥尤单抗("cNK+Dara"或"cNK+达雷妥尤单抗")或g-NK和达雷妥尤单抗("g-NK+Dara"或"g-NK+达雷妥尤单抗")在多发性骨髓瘤的小鼠模型中对肿瘤负荷和存活的治疗效果。将 5×10^5 个荧光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞静脉内注射(I.V.)至雌性NSG小鼠的尾静脉中。每周,持续5周,扩增的NK细胞经I.V.施用(每只小鼠 6.0×10^6 个细胞)和达雷妥尤单抗经I.P.注射(每只小鼠 $10 \mu\text{g}$)。图14A显示了在肿瘤接种后第20、27、37、41、48和57天,每周两次对小鼠进行的BLI成像(左侧)。图右侧显示了相应的治疗后天数。图14B显示了g-NK+Dara组相对于对照组和cNK+Dara组的肿瘤BLI(光子/秒)随时间变化的情况。g-NK组与对照组或cNK组比较,* $p<0.05$ 。图14C显示了随时间的存活百分比,并且箭头表示用cNK+Dara或g-NK+Dara疗法的施用。图14D显示了对照组、cNK+Dara组和g-NK+Dara组的小鼠体重随时间的变化。图14E描述了经cNK+Dara和g-NK+Dara处理的小鼠牺牲时骨髓中 $CD138^+$ 肿瘤细胞的数量。g-NK和cNK细胞的比较,*** $p<0.001$ 。数值为平均值 $\pm$ SE。图14F显示了使用分选策略以分辨对照组和经cNK+Dara或g-NK+Dara处理的小鼠中NK细胞和肿瘤细胞的存在代表性流式细胞图。对照组 $N=8$,g-NK或cNK组 $N=7$ 。

[0077] 图14G显示了在整个研究中收集到的所有对照组、cNK+Dara和g-NK+Dara处理的小

鼠的BLI图像。图14H描述了对照组、cNK+Dara和g-NK+Dara组中所有小鼠牺牲前获得的X射线图像。箭头表示骨折和畸形。每只小鼠下都标有牺牲日期。

[0078] 图15A-C展示了用cNK+Dara或g-NK+Dara处理后的NSG小鼠中,持续性NK细胞的比较数据。所有数据均为牺牲时使用流式细胞仪检测到的细胞数量。图15A显示了血液中cNK和g-NK细胞的数量。图15B显示了脾脏中NK细胞的数量。图15C显示了骨髓中NK细胞的数量。数值为平均值 $\pm$ SE。g-NK和cNK细胞的比较,*** $p < 0.001$ 。

[0079] 图16描述了具有CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}或CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}替代细胞外表面表型的细胞亚群中g-NK(CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}/FcR γ ^{阳性})的百分比。数值为平均值 $\pm$ 标准误差。

[0080] 图17描述了两个独立实验中g-NK细胞的转导后GFP和CD20-CAR表达,每个实验都使用了不同的供体。

[0081] 图18描述了在存在或不存在利妥昔单抗(抗CD20单克隆抗体)的情况下,含有或不含CD20-CAR的g-NK细胞针对Raji淋巴瘤细胞的效力。

[0082] 图19描述了电穿孔后表达CD20 CAR的有活力的g-NK细胞的百分比。

[0083] 图20A和20B展示了Raji淋巴瘤细胞的CD19、CD20和CD38的表达。图20A通过表达CD19来鉴别Raji细胞。图20B证实了Raji细胞的CD20和CD38的表达。

[0084] 图21A和21B证明了在表达或不表达CD20 CAR,以及在存在或不存在达雷妥尤单抗(抗CD38单克隆抗体)的情况下,g-NK细胞表现出针对Raji淋巴瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。图21A描述了在效应物与靶标的比例为0.05:1时,每种条件下Raji细胞死亡百分比。图21B描述了在效应物靶标比为0.05:1的条件下,每种情况下每个NK细胞杀伤的Raji细胞数量。在不包括自发死亡的Raji细胞的情况下计算Raji细胞死亡的百分比。

具体实施方式

[0085] 本文提供了施用缺乏FcR γ 链的表达的工程化自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)与抗体(例如单克隆抗体)组合的方法,所述g-NK细胞包含重组嵌合抗原受体(CAR)。FcR γ 也被称为Fc ϵ R1 γ ,在本文中可互换使用。在一些实施方案中,抗体与g-NK细胞分开施用。在一些实施方案中,抗体可从g-NK细胞中分泌。自然杀伤(NK)细胞是一种先天性淋巴细胞,对于通过分泌细胞因子和趋化因子,以及释放细胞毒性颗粒来介导抗病毒和抗癌免疫反应起着重要作用(Vivier等人Science 331(6013):44-49(2011);Caligiuri,Blood112(3):461-469(2008);Roda等人,Cancer Res.66(1):517-526(2006))。NK细胞是包含第三大淋巴细胞群体的效应细胞,对宿主免疫监控肿瘤和病原体感染细胞非常重要。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,并且被认为仅具有受限的靶标识别能力(Bottino等人,Curr Top Microbiol Immunol.298:175-182(2006);Stewart等人,Curr Top Microbiol Immunol.298:1-21(2006))。

[0086] NK细胞的激活可以通过NK细胞受体与靶细胞上的配体的直接结合发生,如直接肿瘤细胞杀伤,或者通过与结合在携带抗原的细胞上的抗体的Fc部分结合的Fc受体(CD16;又称CD16a或Fc γ RIIIa)的交联而发生。激活后,NK细胞产生大量细胞因子和趋化因子,并且同时表现出强大的溶细胞活性。NK细胞能够通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)杀灭肿瘤细胞。在一些情况下,当NK细胞表面上的受体(如CD16)识别细胞表面结合的IgG1或

IgG3抗体时,触发ADCC。这会触发含有穿孔素和颗粒酶的细胞质颗粒的释放,导致靶细胞死亡。由于NK细胞表达激活性Fc受体CD16,其识别IgG包被的靶细胞,因此扩大靶标识别(Ravetch&Bolland,Annu Rev Immunol.19:275-290(2001);Lanier Nat.Immunol.9(5):495-502(2008);Bryceson&Long,Curr Opin Immunol.20(3):344-352(2008))。ADCC和抗体依赖性细胞因子/趋化因子产生主要由NK细胞介导。

[0087] CD16还以糖基磷脂酰肌醇锚定形式(也被称为Fc γ RIIIB或CD16B)存在。应当理解的是,本文涉及的CD16是指在NK细胞上表达并涉及抗体依赖性反应(如NK细胞介导的ADCC)的CD16a形式,并且这不是指糖基磷脂酰肌醇锚定形式。

[0088] CD16受体能够与适体、TCR-CD3复合物的 ζ 链(CD3 ζ)和/或FcR γ 链结合,通过基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)传递信号。在一些方面,CD16接合(CD16交联)通过细胞内信号启动NK细胞响应,所述细胞内信号通过CD16相关适体链FcR γ 或CD3 ζ 中的一个或两个产生。触发CD16导致 γ 或 ζ 链的磷酸化,进而招募酪氨酸激酶、syk和ZAP-70,启动信号转导级联,从而产生快速且强力的效应功能。最广为人知的效应功能是携带毒性蛋白的细胞质颗粒的释放,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,进而激活和协调一系列免疫反应。

[0089] 这种细胞因子和趋化因子的释放可以在NK细胞的体内抗癌活性中发挥作用。NK细胞在细胞质中还具有小颗粒,其含有穿孔素和蛋白酶(颗粒酶)。从NK细胞释放后,穿孔素在靶向的细胞的细胞膜上形成孔,颗粒酶和相关分子可通过该孔进入,诱导细胞凋亡。NK细胞诱导靶细胞凋亡而非坏死这一事实意义重大——病毒感染细胞的坏死会释放病毒体,而细胞凋亡则导致细胞内的病毒被破坏。

[0090] 缺乏FcR γ 适体蛋白的NK细胞的一个特化亚群,也被称为g-NK细胞,能够介导强健的ADCC反应(参见,例如已公开的专利申请第US2013/0295044号)。增加响应的机制可能是由于影响FcR γ 的表达的表观遗传修饰发生了变化。g-NK细胞表达大量信号传导适体 ζ 链,但缺乏信号传导适体 γ 链的表达。与传统的NK细胞相比,这些 γ 缺失的g-NK细胞当被抗体激活时的活性显著增强。例如,g-NK细胞可以通过抗体介导的CD16交联或抗体包被的肿瘤细胞激活。在一些方面,与表达 γ 链的传统NK细胞相比,g-NK细胞产生大量的细胞因子(如IFN- γ 或TNF- α)和趋化因子(如MIP-1 α 、MIP-1 β 和RANTES)和/或表现出更高的脱颗粒反应。g-NK细胞提供颗粒酶B的高表达,这是自然杀伤细胞细胞毒性机制的组成。此外,与传统的NK细胞相比,g-NK细胞具有更长的寿命,而且其持续性长期存在。在一些实施方案中,g-NK细胞在功能和表型上是稳定的。

[0091] 在一些实施方案中,与传统的NK细胞(如不缺乏 γ 链的NK细胞)相比,g-NK细胞在激发ADCC反应方面更有效。在一些实施方案中,与传统NK细胞相比,g-NK细胞在激发细胞介导的细胞毒性方面更有效,即使在没有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)的一种作用的机制。在一些方面,通过施用NK细胞进行的细胞疗法可与抗体一起用于治疗和相关目的。

[0092] 例如,某些治疗性单克隆抗体,如靶向CD38的达雷妥尤单抗和靶向SLAMF7的埃罗妥珠单抗,已获得FDA批准用于治疗多发性骨髓瘤(MM)等疾病。虽然治疗性抗体的临床应答很有前景,但往往并不理想。例如,虽然最初临床反应通常令人鼓舞,尤其是达雷妥尤单抗,但基本上所有患者最终都出现进展性疾病。因此,亟需新策略来推动更深层次的缓解,或克

服对这些药剂的耐药性。所提供的实施方案,包括组合物,解决了这些需求。

[0093] 本文提供了一种缺乏FcR γ 链的表达的工程化自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞),其还包含重组嵌合抗原受体(CAR)和含有该g-NK细胞的组合物。还提供了工程化g-NK细胞的方法。在一些实施方案中,由于g-NK细胞亚群的亲和力、细胞毒性和/或细胞因子介导的效应功能的改善,工程化g-NK细胞的CAR依赖性抗原靶向使得患者的结果改善。本文发现,CAR依赖性抗原靶向可通过CD16接合和ADCC活性与抗体导向的g-NK细胞的靶向结合。换言之,本文的研究结果证明,即使通过相同的CD3 ζ 信号通路进行信号转导,CAR工程化T细胞中通过ADCC的抗体导向靶向也不会受到影响。这些结果表明,g-NK细胞的两种抗原导向杀伤机制可作为一种组合疗法策略以进一步提高靶细胞的杀伤。

[0094] 与传统的NK细胞相比,这些方法都有所改进。传统的NK细胞通常在当抗体的Fc部分与其Fc受体(Fc γ RIIIIa或CD16a)结合时被激活,并通过涉及适体蛋白CD3 ζ 和Fc ϵ R1 γ 的过程触发激活和脱颗粒。传统NK细胞上的Fc受体CD16的结合和交联通过CD3 ζ 和Fc ϵ R1 γ 二者引发信号传导,这可导致信号传导的可变性,取决于NK细胞中信号传导适体的表达。最后,NK细胞活性的活性通常需要细胞因子的支持,如通过IL-15,以增强细胞毒性活性;因此,缺乏足够支持性细胞因子可能限制应答的持久性。上述每一个因素,无论是单独或共同,都对某些NK细胞疗法的应用造成阻碍。

[0095] 本文提供的工程化NK细胞和含有这些细胞的组合物,如通过所提供的方法产生的细胞,在几个方面提供了一种改进的细胞疗法。首先,所提供的g-NK细胞和含有这些细胞的组合物,如通过所提供的方法产生的细胞,被工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR的表达使得g-NK细胞以不依赖抗体的方式靶向患病受试者或个体中的靶细胞或组织。此外,与单克隆抗体的组合疗法使得g-NK细胞以强效的、ADCC介导的、抗体导向的方式靶向患病受试者或个体的靶细胞或组织。通过此类方法产生的所提供的细胞和组合物在将g-NK细胞靶向到受试者或个体中合适位置的能力方面尤为强大。令人惊讶的是,g-NK细胞具有强效的ADCC活性,且在工程化g-NK细胞中CAR的共表达并不会削弱这种活性,从而使得这些成果得以实现。

[0096] 这两种由抗原驱动的针对靶细胞(如癌细胞)的靶向杀伤机制使得靶向某些癌症的策略得以改进。虽然临床试验结果表明细胞CAR T细胞疗法对一些血液系统恶性肿瘤具有令人鼓舞的临床疗效,但在大约30-50%的接受抗CD19 CAR T细胞治疗后实现缓解的患者中观察到细胞表面抗原表达减弱或完全丧失的复发,这种情况通常在治疗的一年内发生。在定向针对其他靶标(如CD22和B细胞成熟抗原)的CAR中,也有与抗原丢失相关的复发报道,这凸显了抗原逃逸是CAR-T细胞疗法取得成功的一个重大且常见的阻碍因素。除了血液癌症之外,抗原逃逸在实体瘤中可能是一个更大的挑战,实体瘤通常由抗原表达情况各异的细胞组成。因此,靶向单一抗原存在免疫逃逸的风险,且这可以通过靶向多种所需抗原克服这一风险,尤其是在肿瘤异质性更高的实体瘤中。因此,仍然需要改进基于嵌合抗原受体细胞的疗法,使其能够更有效、安全且高效地靶向各种癌症,如B细胞相关的恶性肿瘤(ALL、CLL和NHL)、多发性骨髓瘤、AML、淋巴瘤以及许多其他实体瘤。

[0097] 所提供的实施方案包含涉及组合疗法的方法,所述方法使靶细胞与g-NK细胞接触,所述g-NK细胞经CAR和单克隆抗体工程化,所述CAR含有结合第一抗原的细胞外抗原结合结构域(如scFv),所述单克隆抗体结合第二抗原。第一和第二抗原可以相同或不同。通

常,如果抗原相同,由CAR和单克隆抗体识别的表位是不同的。在特定的方面,第一和第二抗原是不同的,且二者都是已知或疑似在疾病或病症(如癌症)的靶细胞上表达的抗原。在一些实施方案中,第一和第二抗原在相同的靶细胞上表达。在一些实施方案中,第一和第二抗原在不同的靶细胞上表达,这两种抗原都与疾病或病症有关,例如由于肿瘤的异质性。在一些实施方案中,单克隆抗体是一种重组分子,其单独施用至受试者。在一些实施方案中,g-NK细胞经可分泌的单克隆抗体工程化。在一些实施方案中,这些方法涉及向患有疾病或病症(如癌症)的受试者施用g-NK细胞的组合物,所述g-NK细胞经工程化以表达用于靶向第一抗原的CAR和用于靶向第二抗原的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述方法涉及向患有疾病或病症(如癌症)的受试者施用g-NK细胞的组合物,所述g-NK细胞经工程化以表达用于靶向第一抗原的CAR,和经可分泌的单克隆抗体工程化,所述可分泌的单克隆抗体靶向第二抗原。

[0098] 具体地,所提供的实施方案涉及NK细胞组合物,该组合物富集了一个特定亚群的g-NK细胞(即缺乏FceRI γ 的NK细胞),与传统NK细胞或富集了其他亚群的NK细胞相比,所述组合物具有许多优势。g-NK细胞是一个相对罕见的亚群,因为只有25-30%的CMV血清呈阳性的个体中g-NK细胞的检测水平仅占总NK细胞的约3%-10%。例如本文所述的,方法可用于提供特别强大的g-NK细胞扩增和富集,从而实现体内使用所需的充分扩增,同时还可在其扩增之前、期间或之后使用CAR对富集的g-NK细胞进行工程化。通过这种方法产生的所提供的细胞和组合物在将g-NK细胞靶向到受试者或个体中合适位置的能力方面特别强大。

[0099] g-NK细胞在外周血的NK细胞中的比例相对较小,从而限制了将这些细胞用于治疗方法的能力。特定地,为了在临床上利用g-NK细胞,必须具有高优先扩增率,因为g-NK细胞通常是稀有群体。其他用于扩增NK细胞的方法能够实现14天千倍的NK细胞扩增率,但它们收获低分化NKG2C^{阴性}、FceRI γ ^{阳性}(FcR γ ^{阳性})NK细胞(Fujisaki等人(2009)Cancer Res.,69:4010-4017;Shah等人(2013)PLoS One,8:e76781)。此外,研究发现,为扩增表型上与g-NK细胞重叠的NK细胞而优化的扩增不优先扩增g-NK细胞至支持治疗用途的数量。特别地,先前已有报道称,那些在表型上与g-NK细胞存在重叠的NKG2C^{阳性}NK细胞可以通过使用HLA-E转染的221.AEH细胞并在培养基中添加IL-15来优先扩增(Bigley等人(2016)Clin.Exp.Immunol.,185:239-251)。用这种组成型表达HLA-E的HLA表达细胞进行培养,会促使NK细胞朝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)发展。人们曾认为,由于此类细胞中包括g-NK,因此这种方法足以扩增g-NK细胞。然而,这种方法无法实现g-NK细胞的强效扩增。

[0100] 本文所述的扩增方法能够产生富集g-NK细胞的NK细胞组合物,克服了这些限制。相较于先前的方法,所提供的方法利用了更大比例的缺乏HLA I类和HLA II类的HLA-E+饲养细胞(如221.AEH细胞)和NK细胞。特别地,先前的方法使用更低比例的221.AEH细胞,例如比例为10:1的NK细胞与221.AEH细胞。本文发现,更大比例的表达HLA-E的饲养细胞(如221.AEH细胞)使得总体扩增更大而且更偏向于g-NK表型。在一些实施方案中,可以通过辐照饲养细胞来提高HLA-E+饲养细胞(例如221.AEH细胞)的比例。在一些方面,使用辐照的饲养细胞系也具有优势,因为它提供了一种与GMP兼容的方法。在扩增期间加入重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27中的任何一种或其组合也被发现能支持强效扩增。在所提供方法的特定实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,有两种

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,且至少一种重组细胞因子是IL-21。

[0101] 用于扩增g-NK细胞的方法是基于这样一个发现:在IL-21存在下对NK细胞进行扩增培养可使NK细胞活性增强以产生细胞因子或效应分子,如穿孔素和颗粒酶B。本文中扩增过程产生的含有NK细胞的组合物具有高度功能性,表现出强大的增殖能力,即使在它们冷冻后未经复苏处理也能很好地起作用。例如,在IL-21的存在下扩增时,所提供的过程产生的NK细胞不仅表现出很强的ADCC活性,而且还表现出抗体非依赖性细胞毒性活性。这种强健的活性,包括抗体非依赖性细胞毒性活性,特别适用于本文所述的策略,即在这些策略中,细胞进一步经CAR和免疫调节剂工程化,因为在靶抗原与CAR接合后,NK细胞已被激活并准备好发挥效应活性。例如,效应分子(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,从而提供具有高细胞毒性潜能的细胞。如本文所示,通过本文所提供的包含IL-21(如IL-2、IL-15和IL-21)的方法产生的NK细胞组合物,不仅与仅包含IL-2而未添加IL-21的方法产生的NK细胞组合物相比,表现出更高比例的穿孔素或颗粒酶B阳性的NK细胞,而且它们还表现出这些细胞中所述分子的平均表达水平或程度更高。此外,通过本文提供的方法产生的NK细胞组合物包括IL-21(如IL-2、IL-15和IL-12),也产生g-NK细胞组合物,这些组合物响应于靶细胞表现出大量的效应活性,包括脱颗粒和表达更多IFN- γ 和TNF- α 的能力。即使经扩增的NK细胞被冷冻保存并解冻后,这种功能活性仍能高度保留。溶细胞酶的显著增加以及更强大的激活表型是扩增的g-NK细胞诱导肿瘤靶标凋亡能力增强的基础。虽然本文的实施例中示例了在通过CD16交联与抗体结合时的许多这些活性,但当CAR与靶抗原结合时也会产生类似的活性,因为信号传导同样是通过CD3 ζ 介导的。这种显著的抗体非依赖性效应子表型,结合经CAR和免疫调节剂(如细胞因子)进行细胞工程化,也支持g-NK细胞作为单一疗法的潜在应用。

[0102] 此外,在一些实施方案中,g-NK细胞产生的细胞因子的量显著大于表达FcR γ 的自然杀伤细胞。在另一实施方案中,细胞因子是干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或其组合。在一个实施方案中,g-NK细胞产生显著更多量的趋化因子。在一个实施方案中,趋化因子是MIP-1 α ,MIP-1 β 或其组合。在另一实施方案中,g-NK细胞在通过CD3 ζ 信号传导时产生细胞因子或趋化因子,例如可通过CAR的接合或在一些情况下,通过Fc受体CD16的刺激。

[0103] 此外,本文的发现还证明了在存在IL-21的情况下扩增的所提供的NK细胞具有在较长时间内良好持续存在和增殖的潜力,这优于例如仅在IL-2存在而未添加IL-21的情况下扩增得到的细胞。此外,结果表明,冷冻保存的g-NK细胞的持续水平与新鲜的g-NK细胞相当。这种显著改善的持久性突显了新鲜或冷冻保存的g-NK作为一种现成的细胞疗法来增强靶向定向细胞毒性的潜在应用。这一改善的持久性的发现是有优势的,因为许多NK细胞疗法的临床实用性都受到NK细胞持久性有限的影响。

[0104] 研究还发现,在扩增方法之前从细胞样品中富集NK细胞,例如在扩增之前富集CD16或CD57细胞,与最初仅基于CD3耗竭富集NK细胞的方法相比,进一步显著增加g-NK细胞的扩增量。在另一实施方案中,可在扩增前进行的另一富集是通过CD56进行阳性选择和对CD38进行阴性选择或耗竭来富集NK细胞。在另一实施方案中,可在扩增前进行的另一富集是通过CD56进行阳性选择,然后对NK2A^{阴性}进行阴性选择或耗竭以及对CD161^{阴性}进行阴

性选择或耗竭,来富集NK细胞。在另一实施方案中,可在扩增前进行的另一富集是通过对CD57进行阳性选择,然后对NKG2A进行阴性选择或耗竭和/或对NKG2C进行阳性选择,来富集NK细胞。在另一实施方案中,可在扩增前进行的另一富集是通过对CD56进行阳性选择,然后对NKG2A进行阴性选择或耗竭和/或对NKG2C进行阳性选择来富集NK细胞。在任一此类实施方案中,可以在扩增后富集NKG2C^{阳性}和/或NKG2A^{阳性}NK细胞。

[0105] 在任一此类实施方案中,富集的NK细胞可以从含有NK细胞的细胞样品中富集,例如从外周血单核细胞(PBMC)中富集。在一些实施方案中,在从细胞样品中富集NK细胞之前,可以通过阴性选择或耗竭CD3来去除T细胞。在任一此类实施方案中,富集的NK细胞可以从来自人受试者的含有NK细胞且g-NK细胞比例相对高的生物样品(如PBMC)中富集,例如,可以从针对在NK细胞中g-NK细胞比例较高选择的人类受试者的生物样品中富集。在任一此类实施方案中,富集的NK细胞可以从来自人类受试者的含有NK细胞的生物样品中富集,例如PBMC,其中样品含有相对较高比例的NKG2C^{阳性}NK细胞(例如为或约或大于约20%的NKG2C^{阳性}NK细胞)和/或NKG2A^{阳性}NK细胞(例如为或约或大于约70%的NKG2A^{阳性}NK细胞)。在任一此类实施方案中,富集的NK细胞可以从来自人类受试者的含有NK细胞的生物样品中富集,例如PBMC,其中样品含有相对较高比例的NKG2C^{阳性}NK细胞(例如为或约或大于约20%的NKG2C^{阳性}NK细胞)和NKG2A^{阳性}NK细胞(例如为或约或大于约70%的NKG2A^{阳性}NK细胞)。在特定实施方案中,样品所来自的受试者是CMV血清阳性的,因为此类受试者的外周血中可检测到的g-NK细胞更多。

[0106] 总之,所提供的扩增g-NK细胞的方法可实现NK细胞的扩增,从开始培养时的1000万个富集的NK细胞开始,到超过10亿个细胞,在一些情况下甚至达到80亿个细胞或更多。特别地,所提供的方法可实现高产量(>1000倍)扩增率,并在扩增后保持或在一些情况下增强g-NK细胞的功能。在一些实施方案中,所提供的方法可导致表达高水平的穿孔素和颗粒酶B的g-NK细胞群体。此外,还发现所提供的方法足以扩增先前冷冻的NK细胞,而这是许多现有的需要对解冻后的NK细胞进行挽救处理的方法通常无法实现的。在一些实施方案中,这是通过增加扩增方案的持续时间来实现的。在一些实施方案中,这是通过降低HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比例来实现的,例如将HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比例降至约1:1的221.AEH与NK细胞。在一些实施方案中,这是通过加入重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合来实现的。在特定的实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,扩增是在两种或更多种重组细胞因子存在的情况下进行的,其中至少一种是重组IL-21,且至少一种是重组IL-2。

[0107] 如本文所示,本文提供的工程化g-NK细胞和含有这些细胞的组合物,如通过所提供的方法产生的,可用于癌症疗法。在一些实施方案中,NK细胞的过继性转移不导致严重的移植物抗宿主(GVHD),因此这种细胞疗法可以以“现成”的方式用于临床用途。在一些方面,NK细胞可进一步经工程化以减少或消除NK细胞中的个别HLA分子,从而提高所提供细胞疗法的同种异体潜能。

[0108] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请、专利出版物、科学文献和数据库,出于所有目的,均通过引用以其整体并入本文,其程度如同每一篇单独的参考文献都被具体且单独地指明以引用的方式并入本文一样。

[0109] 为了清晰地公开,而非用于限制目的,详细说明内容分为以下几个小节。本文所使

用的章节标题仅出于组织内容的目的,不应被理解为对所描述的主题的限制。

I. 定义

[0110] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、注释和其他技术和科学术语或用语旨在具有与所要求保护的主体所涉及的本领域技术人员通常理解相同的含义。在一些情况下,具有通常理解含义的术语在本文中定义是为了清晰和/或方便参考,并且在本文中包此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的内容存在实质性差异。

[0111] 如本说明书和所附权利要求所用,单数形式“一”、“一种”和“一者”(“a”、“an”和“the”)包括复数指代,除非上下文另有明确规定。因此,举例来说,对“一个分子”的提及任选地包括两个或更多个此类分子的组合,诸如此类。

[0112] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域技术人员所熟知的各数值的通常误差范围。本文中提及的“约”一个值或参数包括(并描述)指向所述值或参数本身的实施方案。

[0113] 可以理解,本文所述的本发明的各个方面和实施方案包括“包含”、“由……组成”和“基本上由……组成”。

[0114] 如本文所用,“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况发生或不发生,以及该描述包括发生所述事件或情况的实例和不发生所述事件或情况的实例。例如,任选取代的基团是指所述基团未被取代或被取代。

[0115] 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(VH)链和/或可变轻(VL)链的全部或至少一部分。通常,VH和VL的配对一起形成抗原结合位点,但在一些情况下,单个VH或VL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。

[0116] 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。

[0117] “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. 8(10):1057-1062[1995]);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。

[0118] 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。

[0119] 术语“同种异体的”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“同种异体的”用于定义从供体移植到相同物种的受体的细胞。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 关于蛋白或核酸的术语“异源的”是指已经转化或引入细胞中的蛋白或核酸。在一些情况下,异源蛋白或核酸对细胞而言是外源性的,例如因为它来源于其他生物体或个体,而不是表达它的细胞。应当理解,对“异源的”的提及并不排除蛋白或核酸也可能由其所引入的细胞天然表达。可将异源核酸或异源的编码的蛋白引入NK细胞中,例如,通过能够将核酸((例如编码异源蛋白的核酸)引入或转化到细胞中的多种方法中的任一种方法,包括基于病毒的方法,诸如通过转导或非病毒递送方法,诸如电穿孔或脂质纳米颗粒递送。已经引入或转化的NK细胞可携带染色体外或整合在染色体中的外源性或异源核酸。整合到细胞基因组和自我复制载体中通常导致转化的核酸分子具有在遗传上稳定的遗传。将含有转化的核酸的NK细胞称为“遗传工程化的”,但也可互换地称为“重组的”或“转化的”。

[0123] 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)、脂质递送和感染。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。脂质纳米颗粒还可用于将核酸((DNA或mRNA)引入细胞中。

[0124] 术语“多核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”和“寡核苷酸”是指DNA和RNA中的一系列核苷酸碱基((也称为“核苷酸”),并且是指两个或更多个核苷酸的任何链。多核苷酸、核苷酸序列、核酸等可以是单链或双链的嵌合混合物或其衍生物或经修饰形式。例如,它们可在碱基部分、糖部分或磷酸骨架处被修饰,以改善分子的稳定性、它的杂交参数等。核苷酸序列通常携带遗传信息,包括但不限于细胞机器用于制造蛋白和酶的信息。这些术语包括双链或单链基因组DNA、RNA、任何合成的和遗传操控的多核苷酸以及有义和反义多核苷酸。这些术语还包括含有经修饰碱基的核酸。

[0125] 术语“蛋白”、“肽”和“多肽”可互换使用,指经由肽键连接在一起的氨基酸的顺序链。这些术语包括单独的蛋白、缔合在一起的蛋白组或复合物,以及此类蛋白的片段或部分、变体、衍生物和类似物。肽序列在本文中使用常规符号呈现,从左侧的氨基或N末端开始,并继续到右侧的羧基或C末端。可使用标准的单字母或三字母缩写。

[0126] 如本文在核酸((例如,基因、编码蛋白的基因组区域、启动子)的上下文中所用,术语“内源性”是指在其天然位置((例如,在细胞的基因组内)的天然核酸或蛋白。相反,如本文在核酸((例如,表达构建体、cDNA、indel和核酸载体)的上下文中所用,术语“外源性”是指已经使用例如遗传工程化技术((诸如异源核酸的转化或者基因编辑,例如基于CRISPR的

编辑技术) 人工引入细胞的基因组中的核酸。

[0127] 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。

[0128] “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。

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 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”。

[0132] “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。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。

[0133] 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。

II. 溶细胞杀伤和治疗的方法

[0134] 本文提供了溶细胞杀伤靶细胞的方法,其涉及g-NK细胞组合物和抗体疗法的组合,所述g-NK细胞组合物包含工程化g-NK细胞,所述工程化g-NK细胞包含编码抗原受体(如CAR)的异源核酸。在一些实施方案中,本文提供的方法涉及使已知或疑似表达第一抗原和第二抗原的靶细胞与以下接触:(a) 包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含与第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及(b) 与第二抗原结合的抗体。在一些实施方案中,溶细胞杀伤靶细胞是在受试者体内发生的。在一些实施方案中,靶细胞与疾病或病症有关,且溶细胞杀伤靶细胞是对该疾病或病症的一种治疗。在一些实施方案中,靶细胞是癌症的细胞,并且所述方法可用于治疗癌症。

[0135] 本文还提供了用于组合疗法的方法和用途,所述组合物疗法涉及g-NK细胞组合物与抗体疗法组合用于治疗疾病或病症,所述g-NK细胞组合物包含工程化g-NK细胞,其包含编码抗原受体的异源核酸(如CAR)。在此类方法中,CAR与由所述疾病或病症的细胞表达的第一抗原结合,并且抗体疗法与由所述疾病或病症细胞表达的第二抗原结合。在一些实施方案中,所述细胞是相同的细胞。在一些实施方案中,抗体被施用至已知或疑似患有疾病或病症的受试者,且与g-NK细胞分开施用。在一些实施方案中,所述疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,所述方法包括:(a)向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述NK细胞疗法包含一定剂量的包含缺乏FcR γ 链的表表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包含与由癌症的细胞表达的第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及(b)向受试者施用一定剂量的抗体,所述抗体与由癌症细胞表达的第二抗原结合。在一些实施方案中,抗体是可从g-NK细胞中分泌的。在一些实施方案中,所述方法包括向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述NK细胞疗法包含一定剂量的组合物,所述组合物包含缺乏FcR γ 链的表表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞),其中:g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包含与由癌症细胞表达的第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及g-NK细胞表达可分泌的抗体,其与由癌症细胞表达的第二抗原结合。

[0136] 在本文所提供的方法中,含有如本文所提供的工程化g-NK细胞的组合物在被抗体或含Fc的蛋白激活或与其接触时表现出ADCC介导的活性。在一些实施方案中,本文所提供的g-NK细胞表现出独特的增强的ADCC活性,例如与传统NK细胞相比。例如,可以通过抗体介导的CD16的交联激活g-NK细胞。在一些实施方案中,本文提供了一种治疗个体的病症的方法,所述方法包括向受试者施用工程化g-NK细胞或其组合物以及抗体。在一些实施方案中,抗体能够与NK细胞表面上的CD16结合并接合。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域。在一些实施方案中,抗体是IgG1 Fc抗体。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在具体的实施方案中,所提供方法中的任何此类抗体是单克隆抗体。

[0137] 在一些方面,本文所提供的方法可以提供一种杀死癌症细胞的双靶向策略。在一些实施方案中,双靶向策略提高对癌症细胞的杀伤作用,从而治疗疾病或病症,例如通过增加靶向癌症细胞的特异性,或在抗原逃逸的情况下提供靶细胞杀伤的补偿策略。在一些实施方案中,本文所提供的方法增加了癌细胞被杀伤的可能性,例如通过两种疗法的累加效应为NK细胞提供不同的溶细胞杀伤机制。

[0138] 此类方法和用途包括治疗性方法和用途,例如其涉及向患有疾病、病症或障碍的受试者施用g-NK。在一些情况下,所述疾病或障碍是肿瘤或癌症。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是病毒感染。在一些实施方案中,细胞和抗体或其药物组合物是以实现疾病或障碍的治疗的有效量施用的。用途包括细胞、抗体或其药物组合物在此类方法和治疗中的用途,以及在制备用于实施此类治疗性方法的药物的用途。在一些实施方案中,所述方法由此治疗受试者的疾病、病况或障碍。

[0139] 在一些实施方案中,本文所提供的涉及包含工程化g-NK细胞的NK细胞组合物的任何方法和用途可包括PCT公开号W02020/107002或PCT申请号PCT/US2021/028504中所述的方法和用途。

[0140] 本文所提供的工程化g-NK细胞组合物可用于治疗具有肿瘤或过度增殖性障碍的

个体的方法。可施用本文所提供的工程化g-NK细胞组合物用于治疗动物,如哺乳动物,例如人受试者。在一些实例中,所述方法包括治疗过度增殖性障碍,如血液系统恶性肿瘤或实体瘤。可以用本文描述的组合物治疗的癌症和过度增殖性障碍的类型的实例包括但不限于多发性骨髓瘤、白血病(例如,成髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病、红白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如,霍奇金氏病(Hodgkin's disease)和非霍奇金氏病(non-Hodgkin's disease))、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、肾细胞癌、肝癌、威尔姆氏瘤(Wilm's tumor)、宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育不良和增生。癌症的治疗和/或预防包括但不限于减轻与癌症有关的一种或多种症状、抑制或减少癌症的发展、促进癌症的消退和/或促进免疫应答。

[0141] 在一些实施方案中,第一和第二抗原与癌症有关。在一些实施方案中,第一和第二抗原在相同的癌症靶细胞上表达。在一些实施方案中,第一抗原在癌症的第一靶细胞上表达,并且第二抗原在癌症的第二靶细胞上表达。

[0142] 在一些实施方案中,癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,此类癌症中的任一种是复发/难治性癌症。在一些实施方案中,受试者患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓细胞白血病(AML)或多发性骨髓瘤。

[0143] 在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原选自CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD79b、CD123、SLAMF7、GPRC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。

[0144] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,多发性骨髓瘤是复发/难治性的。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原选自CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPRC5D和BCMA组成的组。本领域技术人员熟知针对此类抗原的各种嵌合抗原受体(CAR)或单克隆抗体中的任一种。本文描述了示例性CAR和抗体。

[0145] 在一些实施方案中,CAR是抗BCMACAR,并且单克隆抗体是抗CD38抗体。本领域技术人员知晓许多抗BCMACAR。在III.A节中描述了示例性抗BCMACAR。在一些实施方案中,抗CD38抗体是达雷妥尤单抗(DarzalexTM)。在一些实施方案中,抗CD38抗体是伊莎妥昔单抗(isatuximab)。

[0146] 在一些实施方案中,抗CD38抗体可皮下施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体(如达雷妥尤单抗)可以在包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物中施用。例如,抗体可以作为包括达雷妥尤单抗和重组人透明质酸酶PH20(如透明质酸酶-fihj)的抗CD38抗体组合物施用。已公布的美国专利公开号US20170121414描述了此类组合物的实例。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的抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)和为或为约15000个单位(U)至约45000U的透明质酸酶(例如透明质酸酶-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(如达雷妥尤单抗)和约30000U透明质酸酶(如透明质酸酶-fihj)。

[0147] 在一些实施方案中,CAR是抗BCMACAR,并且单克隆抗体是抗SLAMF7抗体。本领域技术人员知晓许多抗BCMACAR。在III.A节中描述了示例性抗BCMACAR。在一些实施方案中,抗体是埃罗妥珠单抗(如**EMPLICITI®**)。

[0148] 在一些实施方案中,CAR结合第一抗原,所述第一抗原是CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5或GPC5D,且单克隆抗体结合BCMA。本领域技术人员熟知定向针对此类抗原的CAR。在III.A节描述了示例性CAR。在一些实施方案中,抗体是玛贝妥单抗(如Blenrep)。

[0149] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是淋巴瘤。在一些实施方案中,淋巴瘤是非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)。在一些实施方案中,淋巴瘤是复发/难治性淋巴瘤,如复发/难治性NHL。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原选自由CD19、CD20、CD22、ROR1、CD30、CD38和CD79b组成的组。在一些实施方案中,第一和第二抗原选自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。在一些实施方案中,第一和第二抗原中的一个也可以是CD38。本领域技术人员知晓针对此类抗原的各种CAR或单克隆抗体中的任一种。本文中描述了示例性CAR和抗体。

[0150] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,并且抗体是抗CD20抗体。本领域技术人员知晓许多抗CD19 CAR。在III.A节中描述了示例性抗CD19 CAR。在一些实施方案中,抗体是利妥昔单抗(如**Rituxan®**)。在一些实施方案中,抗体是奥妥珠单抗(obinutuzumab)。在一些实施方案中,抗体是奥法木单抗(ofatumumab)。在一些实施方案中,抗体是替伊莫单抗(ibritumomab)。在一些实施方案中,抗体是托西图单抗(tositumomab)。在一些实施方案中,抗体是乌利妥昔单抗(ublrituximab)。

[0151] 在一些实施方案中,抗CD20抗体可皮下施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体(如利妥昔单抗)可以在包括透明质酸酶的抗CD20抗体组合物中施用。例如,抗体可以作为包括利妥昔单抗和重组人透明质酸酶PH20的抗CD20抗体组合物施用。此类组合物的示例性实例在已公开的PCT公开号W02011029892中描述。

[0152] 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的抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)和为或为约15000个单位(U)至约45000U的透明质酸酶(例如透明质酸酶)。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(如利妥昔单抗)和约23400U透明质酸酶。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(如利妥昔单抗)和约26800U透明质酸酶。

[0153] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,并且抗体是抗CD30抗体。本领域技术人员知晓许多抗CD19 CAR。在III.A节中描述了示例性抗CD19 CAR。在一些实施方案中,抗体是抗CD30抗体。在一些实施方案中,抗体是布伦图昔单抗(brentuximab, **ADCETRIS®**)。

[0154] 在一些实施方案中,CAR是抗CD20 CAR,并且抗体是定向针对CD19、CD20、CD22、ROR1或CD30的抗体。本领域技术人员知晓许多抗CD20 CAR。在III.A节中描述了示例性抗CD20 CAR。本领域技术人员知晓针对此类抗原的各种单克隆抗体中任一种。在一些实施方案中,抗体是抗CD19抗体。在一些实施方案中,抗CD19抗体是坦昔妥单抗(tafasitamab) (如**MONJUVI®**)。在其他实施方案中,抗CD19抗体是朗妥昔单抗(loncastuximab) (如**ZYNLONTA®**)。在一些实施方案中,抗CD19抗体是博纳吐单抗(blinatumomab)。在一些实施方案中,抗CD19抗体是地宁妥珠单抗(denintuzumab)。在一些实施方案中,抗体是抗CD30抗体。在一些实施方案中,抗CD30抗体是布伦图昔单抗(brentuximab) (**ADCETRIS®**)。本文描述了示例性抗体。

[0155] 在一些实施方案中,CAR是抗CD20 CAR,并且抗体是定向针对CD38的抗体。本领域技术人员知晓许多抗CD20 CAR。在III.A节中描述了示例性抗CD20 CAR。在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,并且抗体是定向针对CD38的抗体。本领域技术人员知晓许多抗CD19 CAR。在III.A节中描述了示例性抗CD19 CAR。在一些实施方案中,抗CD38抗体是达雷妥尤单抗(Darzalex™)。在一些实施方案中,抗CD38抗体是伊莎妥昔单抗(isatuximab)。在一些实施方案中,抗CD38抗体可皮下施用。在一些实施方案中,抗CD38抗体(如达雷妥尤单抗)可以在包括透明质酸酶的抗CD38抗体组合物中施用。例如,抗体可以作为包括达雷妥尤单抗和重组人透明质酸酶PH20(如透明质酸酶-fihj)的抗CD38抗体组合物施用。已公布的美国专利公开号US20170121414描述了此类组合物的实例。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的抗CD38抗体(例如达雷妥尤单抗)和为或为约15000个单位(U)至约45000U的透明质酸酶(例如透明质酸酶-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(如达雷妥尤单抗)和约30000U透明质酸酶(如透明质酸酶-fihj)。

[0156] 在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是白血病。在一些实施方案中,白血病是复发/难治性白血病,如复发/难治性AML。在一些实施方案中,白血病是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,第一和第二抗原选自CD123、Flt3、CD70、CD33、CLEC12A和CD38组成的组。本领域技术人员知晓针对此类抗原的各种单克隆抗体和CAR中任一种。

[0157] 在一些实施方案中,g-NK细胞具有低CD38表达或没有CD38表达,例如其中g-NK细胞组合物中少于25%的细胞对于表面CD38呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞组合物中的细胞未经工程化以减少或消除CD38表达。这是因为发现g-NK细胞不表达CD38。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。

[0158] 在一些实施方案中,癌症是实体恶性肿瘤。在一些实施方案中,实体肿瘤包括但不限于肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和乳腺癌,包括三阴性乳腺癌。例如,适应症包括癌症中骨病或骨转移,无论原发肿瘤的起源如何;乳腺癌,包括非限制性实例,ER/PR+乳腺癌、Her2+乳腺癌、三阴性乳腺癌;结直肠癌;子宫内膜癌;胃癌;胶质母细胞瘤;头颈癌,如食道癌;肺癌,例如非限制性实例,非小细胞肺癌;多发性骨髓瘤卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;肉瘤,如骨肉瘤;肾癌,如非限制性实例,肾细胞癌;和/或皮肤癌,如非限制性实例,鳞状细胞癌,基底细胞癌或黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是皮肤鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是食道鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,癌症是肺鳞状细胞癌。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原选自GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUC16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 组成的组。本领域技术人员知晓针对此类抗原的各种单克隆抗体和CAR中任一种。

[0159] 在一些实施方案中,治疗的方法或用途涉及向个体施用有效量的如本文提供的g-NK细胞组合物的细胞,如含有如本文提供的工程化g-NK细胞的组合物,包括任何此类如本文童工的方法产生的扩增的NK细胞的组合物。在一些实施方案中,为或为约 10^5 至约 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 $10^{9\text{到}10^{11}}$ 和为或为约 10^{10} 个本文所提供的此类g-NK细胞组合物, 诸如如本文所提供的包含工程化NK细胞的组合物, 包括通过本文所提供的方法制备的任何组合物, 被施用至个体受试者。在一些实施方案中, 一定剂量的细胞被施用至所述个体, 所述一定剂量的细胞包含为或大于为或约 10^5 、为或大于为或约 10^6 、为或大于为或约 10^7 、为或大于为或约 10^8 、为或大于为或约 10^9 、为或大于为或约 10^{10} 、为或大于为或约 10^{11} 或为或大于为或约 10^{12} 个如本文所提供的此类g-NK细胞组合物中的细胞, 诸如如本文提供的含有工程化NK细胞的组合物, 包括通过所提供的方法生产的任何组合物。

[0160] 在一些实施方案中, 治疗的方法或用途涉及向个体施用有效量的任何所提供的NK细胞组合物中的细胞, 包括如本文所述的任何工程化g-NK细胞组合物。在一些实施方案中, 为或为约 10^5 至为或为约 10^{12} , 或为或约 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 至为或为约 10^{11} , 或为或为约 10^9 和为或为约 10^{10} 个来自任何所提供的含有工程化g-NK细胞的组合物的细胞被施用至个体受试者。在一些实施方案中, 一定剂量的细胞被施用至个体, 所述一定剂量的细胞含有为或大于或约 10^5 、为或大于为或约 10^6 、为或大于为或约 10^7 、为或大于为或约 10^8 、为或大于为或约 10^9 、为或大于为或约 10^{10} 、为或大于为或约 10^{11} 或为或大于为或约 10^{12} 个来自所提供的含有工程化g-NK细胞的组合物的细胞。在一些实施方案中, 每kg为或为约 10^6 至 10^{10} 个所提供的含有工程化g-NK细胞的组合物中的此类细胞被施用至所述受试者。

[0161] 在一些实施方案中, 含有工程化g-NK细胞的组合物每周施用一次, 持续预先确定数量的剂量。

[0162] 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。。

[0163] 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。。

[0164] 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, 周期方案是21天周期。在一些实施方案中, 在21天周期中施用三次每周一次剂量。在一些实施方案中, 21天周期重复两次。在一些实施方案中, 21天周期重复三次。

[0165] 在一些实施方案中, 向受试者每周一次施用有效量的任何公开的细胞或含有本文公开的工程化g-NK细胞的组合物, 持续五周。

[0166] 在一些实施方案中, 每个剂量的含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物中的细胞可以为或约为或约 1×10^8 个细胞至为或约 50×10^9 个g-NK细胞组合物中的细胞。在一些实施方案中, 每个剂量的含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物中细胞可以为或可以为 5×10^8 个g-NK细胞组合物中的细胞。在一些实施方案中, 每个剂量的含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物的细胞可以为或可以为约 5×10^9 个g-NK细胞组合物中的细胞。在一些实施方案中, 每个剂量的含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物中的细胞可以为或可以为约 10×10^9 个g-NK细胞组合物中的细胞。

[0167] 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 个细胞/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。

[0168] 在一些实施方案中,剂量以组合物中与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,剂量以如提供的工程化细胞(例如通过所提供的方法产生的)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。

[0169] 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

$\times 10^8$ 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。

[0170] 在一些实施方案中,一定剂量的含有工程化g-NK细胞的组合物的细胞在根据所提供的方法扩增和/或工程化后不久被施用至个体。在其他实施方案中,含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物在施用(例如通过前述方法)前被储存起来。例如,NK细胞可在施用至个体前储存大于6个月、12个月、18个月或24个月。

[0171] 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。

[0172] 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。在一个实例中,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。

[0173] 在一些方面,一旦细胞被施用于受试者(例如,人类),工程化细胞群体的生物活性可以通过许多已知方法中的任何一种来测量。

[0174] 在一些实施方案中,抗体是治疗性单克隆抗体,如抗肿瘤抗原或抗癌抗体。本领域技术人员可以选择适当的治疗性(如抗癌)单克隆抗体,以用本文所述的提供的工程化g-NK细胞和组合物施用至受试者,例如根据个体的特定疾病或病症。合适的抗体可包括多克隆抗体、单克隆抗体、片段抗体(如Fab片段)、单链抗体和其他形式的特异性结合分子。

[0175] 在一些实施方案中,抗体可进一步包括人源化或人抗体。非人抗体的人源化形式是嵌合的Ig、Ig链或片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列),其含有来源于非人Ig的最小序列。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域。

[0176] 通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化是通过将啮齿动物的CDR或CDR序列替换为人抗体的相应序列来实现的(Jones等人,1986;Riechmann等人,1988;Verhoeyen等人,1988)。此类“人源化”抗体是嵌合抗体(1989),其中实质上少于完整的人可变结构域已被来自非人类物种的相应序列所取代。实际上,人源化抗体通常是人抗体,在人抗体中一些CDR残基和可能的一些Fc残基被啮齿类动物抗体中类似位点的残基取

代。人源化抗体包括人抗体(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)的残基被非人类物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔(具有所需的特异性、亲和力和能力)的CDR的残基所取代。在一些情况下,相应的非人残基取代人抗体的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导入的CDR或框架序列中的残基。通常,人源化抗体基本上包含至少一个(通常是两个)可变结构域的全部,其中大多数(如果不是全部)CDR区对应于非人Ig的区域,且大多数(如果不是全部)FR区对应于人抗体共有序列的那些区域。人源化抗体优选还包含抗体恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人抗体的恒定区(Jones等人,1986;Presta, 1992;Riechmann等人,1988)。

[0177] 人抗体也可以通过各种技术产生,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,1991; Marks等人,1991)和人mAb的制备(Boerner等人,1991;Reisfeld and Sell,1985)。类似地,将人Ig基因引入内源性抗体基因部分或完全失活的转基因动物中,也可用于合成人Ab。在挑战后,观察到人抗体的产生,其在所有方面都与人类非常相似,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 and Huszar,1995;Lonberg等人,1994;Marks等人,1992;1997;1997;1997)。

[0178] 本领域技术人员会明白,本申请的工程化g-NK细胞适合与识别肿瘤相关抗原的各种抗体一起使用。肿瘤相关抗原的非限制性实例包括CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、 α -胎儿蛋白、粘蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整合素 α v β 3、整合素 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、多配体蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或腱生蛋白。在一些情况下,抗体是抗CD20抗体(如利妥昔单抗)、抗HER2抗体(如西妥昔单抗)、抗CD52抗体、抗EGFR抗体和抗CD38抗体(如达雷妥尤单抗)、抗SLAMF7抗体(如埃罗妥珠单抗)。

[0179] 可用于所提供的方法中与包括g-NK细胞的细胞组合物联合治疗的非限制性抗体包括曲妥珠单抗(Trastuzumab) (Herceptin®)、雷莫芦单抗(Ramucirumab) (Cyramza®)、阿特珠单抗(Atezolizumab) (Tecentriq™)、纳武单抗(Nivolumab) (Opdivo®)、德瓦鲁单抗(Durvalumab) (Imfinzi™)、阿维鲁单抗(Avelumab) (Bavencio®)、派姆单抗(Pembrolizumab) (Keytruda®)、贝伐单抗(Bevacizumab) (Avastin®)、依维莫司(Everolimus) (Afinitor®)、帕妥珠单抗(Pertuzumab) (Perjeta®)、恩美曲妥珠单抗(ado-Trastuzumab emtansine) (Kadcyla®)、西妥昔单抗(Cetuximab) (Erbix®)、地诺单抗(Denosumab) (Xgeva®)、利妥昔单抗(Rituximab) (Rituxan®)、阿仑单抗(Alemtuzumab) (Campath®)、奥法木单抗(Ofatumumab) (Arzerra®)、奥妥珠单抗(Obinutuzumab) (Gazyva®)、耐昔妥珠单抗(Necitumab) (Portrazza™)、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan) (Zevalin®)、本妥昔单抗(Brentuximab vedotin) (Adcetris®)、司妥昔单抗(Siltuximab) (Sylvant®)、硼替佐米(Bortezomib) (Velcade®)、达雷妥尤单抗(Darzalex™)、埃罗妥珠单抗(Empliciti™)、地努妥昔单抗(Dinutuximab) (Unituxin™)、奥马珠单抗(Olaratumab) (Lartruvo™)、奥克莱珠单抗(Ocrelizumab)、伊莎妥昔单抗(Isatuximab)、

Truxima、Blitzima、Ritemvia、Rituzena、Herzuma、Ruxience、ABP 798、Kanjinti、Ogivry、BI 695500、Novex (RTXM83)、托西图单抗 (Tositumomab) 或 Ontruzant 或其生物类似物。示例性抗体包括利妥昔单抗、曲妥珠单抗、阿利妥珠单抗、西妥昔单抗、达雷妥尤单抗、维妥珠单抗、奥法木单抗、乌利昔单抗、奥卡珠单抗或埃罗妥珠单抗。

[0180] 在一些实施方案中,抗体可以是抗PD-1或抗PD-L1抗体。靶向PD-1或PD-L1的抗体包括但不限于纳武单抗、派姆单抗或阿特珠单抗。

[0181] 可以选择对选择的癌症类型具有特异性的抗体,且所述抗体包括被批准用于治疗癌症的任何抗体。实例包括用于乳腺癌的曲妥珠单抗 (Herceptin)、用于淋巴瘤的利妥昔单抗 (Rituxan®) 和用于头颈部鳞状细胞癌的西妥昔单抗 (Erbix)。本领域技术人员熟悉FDA批准的能够结合特定肿瘤或疾病抗原的单克隆抗体,其中任何一种抗体都能够根据所提供的方法用于治疗肿瘤或疾病。

[0182] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗胃或胃食管交界处的腺癌,并且抗体是曲妥珠单抗 (赫赛汀®) 或雷莫芦单抗 (Cyramza®)。

[0183] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗膀胱癌,并且抗体是阿特珠单抗 (Tecentriq™)、纳武单抗 (Opdivo®)、德瓦鲁单抗 (Imfinzi™)、阿维鲁单抗 (Bavencio®) 或派姆单抗 (Keytruda®)。

[0184] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗脑癌,并且抗体是贝伐单抗 (Avastin®)。

[0185] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗乳腺癌,并且抗体为曲妥珠单抗 (Herceptin®)。

[0186] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗宫颈癌,并且抗体是贝伐单抗 (Avastin®)。

[0187] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗结直肠癌,并且抗体是西妥昔单抗 (Erbix®)、帕尼单抗 (Vectibix®)、贝伐单抗 (Avastin®) 或雷莫芦单抗 (Cyramza®)。

[0188] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗内分泌/神经内分泌肿瘤,并且抗体是阿维鲁单抗 (Bavencio®)。

[0189] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗头颈癌,并且抗体是西妥昔单抗 (Erbix®)、派姆单抗 (Keytruda®)、纳武单抗 (Opdivo®)、曲妥珠单抗或雷莫芦单抗。

[0190] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗骨癌,并且抗体是地诺单抗 (Xgeva®)。

[0191] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗肾癌,并且抗体是贝伐单抗 (Avastin®) 或纳武单抗 (Opdivo®)。

[0192] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗白血病,并且抗体是利妥昔单抗 (Rituxan®)、阿仑单抗 (Campath®)、奥法木单抗 (Arzerra®)、奥妥珠单抗 (Gazyva®) 或博纳吐单抗 (Blincyto®)。

[0193] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗肺癌,并且抗体是贝伐单抗 (Avastin®)、雷莫芦单抗 (Cyramza®)、纳武单抗 (Opdivo®)、耐昔妥珠单抗 (Portrazza™)、派姆单抗 (Keytruda®) 或阿特珠单抗 (Tecentriq™)。

[0194] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗淋巴瘤,并且抗体是替伊莫单抗 (Zevalin®)、本妥昔单抗 (Adcetris®)、利妥昔单抗 (Rituxan®)、司妥昔单抗 (Sylvant®)、奥妥珠单抗 (Gazyva®)、纳武单抗 (Opdivo®) 或派姆单抗 (Keytruda®)。

[0195] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗多发性骨髓瘤,并且抗体是硼替佐米(Velcade®)、达雷妥尤单抗(Darzalex™)或埃罗妥珠单抗(Empliciti™)。

[0196] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗成神经细胞瘤,并且抗体是地努妥昔单抗(Unituxin™)。

[0197] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌,并且抗体为贝伐单抗(Avastin®)。

[0198] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗胰腺癌,并且抗体是西妥昔单抗(Erbitux®)或贝伐单抗(Avastin®)。

[0199] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗皮肤癌,并且抗体是伊匹单抗(Yervoy®)、派姆单抗(Keytruda®)、阿维鲁单抗(Bavencio®)或纳武单抗(Opdivo®)。

[0200] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗软组织肉瘤,并且抗体为奥马珠单抗(Lartruvo™)。

[0201] 表1列出了根据所提供的方法的示例性第一和第二抗原以及CAR和抗体的组合。

表1. 示例性第一和第二抗原以及CAR和抗体的组合

适应症	抗原靶标(第一和第二抗原)	示例性CAR和抗体	
多发性骨髓瘤	CD38、SLAMF7、	抗BCMA CAR	

	CD138、FCRH5、GPRC5D 和 BCMA	抗CD38抗体	达雷妥尤单抗 伊莎妥昔单抗
		抗SLAMF7抗体	埃罗妥珠单抗
		抗BCMA抗体	玛贝妥单抗-blmf
淋巴瘤 (如 NHL)	CD19、CD20、CD22、ROR1 和 CD30	抗CD19 CAR 抗CD20 CAR 抗CD22 CAR	
		抗CD20抗体	利妥昔单抗 奥妥珠单抗 奥法木单抗
		抗CD19抗体	坦昔妥单抗-cxix
		抗CD38抗体	达雷妥尤单抗 伊莎妥昔单抗
		抗CD22 ADC	莫塞妥莫单抗 (moxetumomab pasudodox)
		抗CD30 ADC	本妥昔单抗
		抗CD79 ADC	泊洛妥珠单抗-piiq
		抗CD19 ADC	朗妥昔单抗-lpyl
白血病 (如 AML)	CD123、Flt3、CD70、CD33、CLEC12A、CD3、B7H3	抗CD33 CAR 抗CD123 CAR 抗B7H3 CAR 抗 CLEC12A CAR 抗CD33 CAR	
		抗CD123抗体	CSL362
		抗CD33抗体	林妥珠单抗
		抗Flt3抗体	LY3012218 (IMC-EB10)
		抗CD70抗体	库沙珠单抗(cusatuzumab)
实体瘤	GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III (EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUC16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、PDL1、CCR4、组	抗间皮素CAR 抗生存素CAR 抗ROR1 CAR 抗B7H3 CAR	
		抗EGFR抗体	西妥昔单抗、帕尼单抗 耐昔妥珠单抗
		抗VEGF抗体	贝伐单抗
		抗VEGFR2抗体	雷莫芦单抗
		抗B7H3抗体	
		抗Her2 和或3 抗体	曲妥珠单抗和生物类似药) 帕妥珠单抗 泽尼达妥单抗
		抗Her2 ADC	恩美曲妥珠单抗 (ado-trastuzumab emtansine) 德喜曲妥珠单抗 (am-trastuzumab-deruxtecan-nxki)

	织因子和IL-13 α	抗Trop2 ADC	替朗妥昔单抗 (oncastuximab tesirine-lpyl) 赛妥珠单抗 (sacituzumab govitecan-hziy)
		抗PDL1抗体	阿维鲁单抗
		抗GD2抗体	丁妥昔单抗(dintuximab) 那西妥单抗(naxitamab-gqgk)
		抗CCR4抗体	莫格利珠单抗(mogamulizumab)
		抗PDGFR α	奥马珠单抗
		抗粘连蛋白4 ADC	恩诺单抗 (enfortumab vedotin-ejfv)
		抗组织因子 ADC	替索单抗(tisotumab vedotin-tftv)
		抗CLDN6抗体	ASP1650/IMAB027
		抗FGFR2b抗体	贝玛妥珠单抗(bemarituzumab)

[0202] 在特定实例中,受试者在施用含有工程化g-NK细胞的群体之前、之后或基本同时施用有效剂量的抗体。在一些实例中,向受试者施用约0.1mg/kg至约100mg/kg的抗体(诸如约0.5-10mg/kg、约1-20mg/kg、约10-50mg/kg、约20-100mg/kg,例如约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约8mg/kg、约10mg/kg、约16mg/kg、约20mg/kg、约24mg/kg、约36mg/kg、约48mg/kg、约60mg/kg、约75mg/kg或约100mg/kg)。有效量的抗体可由熟练的临床医生根据特定抗体、特定疾病或病症(如肿瘤或其他疾病)、受试者的一般情况、受试者正在接受或先前已接受的任何其他治疗以及其他相关因素进行考虑以选择。受试者还被施用含有本文所述工程化g-NK细胞的群体。抗体和工程化g-NK细胞群体二者通常都是肠外施用的,例如通过静脉内;但也可使用肿瘤或肿瘤附近的注射或输注(局部施用),或腹腔的施用。本领域技术人员可以确定适当的施用途径。

[0203] 在一些实施方案中,至少一个剂量的抗体的施用可在施用g-NK细胞的组合物前一个月内开始。在一些实施方案中,至少一个剂量的抗体的施用可在施用g-NK细胞的组合物前三周内开始。在一些实施方案中,至少一个剂量的抗体的施用可在施用g-NK细胞的组合物前两周内开始。

[0204] 在特定实例中,受试者在施用g-NK细胞的群体之前、之后或基本同时施用有效剂量的抗体。有效量的抗体可由熟练的临床医生根据特定抗体、特定疾病或病症(如肿瘤或其他疾病)、受试者的一般情况、受试者正在接受或先前已接受的任何其他治疗以及其他相关因素进行考虑以选择。受试者还被施用了本文所述的g-NK细胞群体。抗体和g-NK细胞的群体二者通常都是肠外施用的,例如通过静脉内;但也可使用肿瘤或肿瘤附近的注射或输注(局部施用),或腹腔的施用。本领域技术人员可以确定适当的施用途径。

[0205] 在一些实施方案中,抗体可以每周一次剂量施用。在一些实施方案中,抗体可以以周期方案施用。在一些实施方案中,抗体以28天的周期施用。在一些实施方案中,抗体施用一个或两个28天的周期。在一些实施方案中,抗体在至少一个周期(如每个周期)中每周施用一次。在一些实施方案中,抗体每周施用一次持续4周、6周、8周、10周、12周、16周、20周、24周、28周、32周、36周或更长时间。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。

[0206] 在一些实施方案中,抗体可以是静脉内施用的。

[0207] 在一些实施方案中,抗体是达雷妥尤单抗,并且每个剂量的抗体可以以可为或为约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。

[0208] 在一些实施方案中,抗SLAMF7抗体(如埃罗妥珠单抗)可以以可为或约10mg/kg每周的量施用,持续两个周期,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(lenalidomide)和地塞米松(dexamethasone)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(diphenhydramine)、雷尼替丁(ranitidine)和对乙酰氨基酚(acetaminophen)之后施用。

[0209] 在一些实施方案中,抗BCMA抗体(如玛贝妥单抗(Blenrep))可按照为或为约2.5mg/kg以静脉内输注来施用,持续为或约30分钟。在一些实施方案中,抗BCMA抗体(如玛贝妥单抗(Blenrep))每三周施用一次。

[0210] 在一些实施方案中,抗CD20抗体的每个剂量可以以为或为约250mg/m²至为或为约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。

[0211] 在一些实施方案中,抗CD20抗体组合物可以每周一次剂量施用。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,抗体在静脉内每周一次剂量的抗CD20抗体之后皮下施用3或7个剂量。在一些实施方案中,所述方法包括每周施用一次抗CD20抗体,持续8个总剂量,以及每周施用一次g-NK细胞组合物,持续6个总剂量,其中一个剂量或两个剂量的抗CD20抗体在施用包括g-NK细胞的组合物之前施用。

[0212] 在一些实施方案中,抗CD19抗体(如坦昔妥单抗)以为或为约12mg/kg施用。在一些实施方案中,抗CD19抗体(如坦昔妥单抗)以四个周期施用。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,第四周期及以后的周期包括在28天周期的第1和15天施用。在一些实施方案中,抗CD19抗体(如坦昔妥单抗)以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个周期施用。

[0213] 在一些实施方案中,抗CD19抗体(如朗妥昔单抗)每3周一次以为或为约0.15mg/kg施用,持续2个周期。在一些实施方案中,对于后续周期,抗CD19抗体(如朗妥昔单抗)每3周一次以为或为约0.075mg/kg施用。在一些实施方案中,在抗CD19抗体(如朗妥昔单抗)的施用之前施用地塞米松。

[0214] 在一些实施方案中,抗CD30抗体(如布伦图昔单抗)可以以为或为约1.8mg/kg施用。在一些实施方案中,抗CD30抗体(如布伦图昔单抗)以最大量达180mg施用。在一些实施方案中,抗CD30(如布伦图昔单抗)每三周施用一次。

[0215] 在一些实施方案中,抗体是可分泌的抗体。

A. 组合疗法

[0216] 在一些实施方案中,所提供的方法可以与一种或多种其他药剂一起作为组合疗法实施。在此类实施方案中,含有如本文提供的工程化g-NK细胞的组合物可在一种或多种其他药剂的施用之前、同时或之后施用。例如,一定剂量的工程化g-NK细胞可与抗微生物、抗病毒和其他治疗性剂同时或依次施用。在一些实施方案中,所述方法与向受试者施用化疗剂、细胞毒剂或免疫调节剂组合进行。下文各节描述了示例性组合疗法。

[0217] 工程化g-NK细胞和另外的药剂可依序或同时施用。在一些实施方案中,另外的药剂在施用g-NK细胞之前施用。在一些实施方案中,另外的药剂在施用工程化g-NK细胞之后

施用。例如,工程化g-NK细胞可以与对选择的癌症类型特异的抗体同时施用。或者,可以在选择的时间施用工程化的g-NK细胞,所述时间与施用选择的癌症类型特异的抗体的时间不同。

1. 细胞因子和生长因子

[0218] 在本文提供的一些实施方案中,工程化g-NK细胞或含有这些细胞的组合物可与细胞因子和/或生长因子组合施用至个体。在本文提供的一些实施方案中,工程化g-NK细胞或含有这些细胞的组合物可与其他的外源施用的细胞因子和/或生长因子组合施用至个体。由于细胞因子是NK细胞活性所必需的,因此普遍的方法涉及将外源性细胞因子与作为外源性细胞因子的支持的NK细胞疗法组合施用至受试者。

[0219] 根据一些实施方案,至少一种生长因子或细胞因子包含选自由SCF、FLT3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21和IL-27组成的组的生长因子。在特定的实施方案中,向受试者施用重组IL-2。在其他特定的实施方案中,向受试者施用重组IL-15。在其他特定的实施方案中,向受试者施用重组IL-21。

[0220] 在一些实施方案中,至少一种细胞因子与工程化g-NK细胞或其组合物组合施用至受试者。

[0221] 细胞因子是在细胞信号传导中,特别是在免疫系统环境中起重要作用的一大类蛋白。已经表明细胞因子作为免疫调节剂在自分泌、旁分泌和内分泌信号传导中发挥作用。细胞因子可作为免疫激活剂起作用,从而刺激免疫介导的响应,或作为免疫抑制剂起作用,从而减弱免疫介导的响应。细胞因子包括趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子,但通常不包括激素或生长因子白介素。

[0222] 在一些实施方案中,细胞因子是白介素。白介素是一组细胞因子,通常是介导广泛的免疫响应的分泌蛋白和信号分子。例如,白介素(IL)-2在调节白细胞活性中发挥作用,而白介素(IL)-15通过调节先天免疫系统和适应性免疫系统的细胞活性而在对微生物入侵者和寄生虫的炎性和保护性免疫响应的发展中发挥主要作用。在一些实施方案中,NK细胞(包括所提供的g-NK细胞)的一种或多种活性由IL-2、IL-21和/或IL-15或所描述的另一种细胞因子调节白介素白介素白介素白介素。

[0223] 在一些实施方案中,白介素包括由免疫细胞诸如淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞产生的细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是免疫激活细胞因子,其可用于诱导NK细胞来诸如促进NK细胞存活、激活和/或增殖。例如,某些细胞因子(诸如IL-15或IL-21)可防止或减少NK细胞经历衰老,诸如通过提高它们体外或体内扩增的能力来实现。在一些实施方案中,白介素或其功能部分是IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-18或IL-21中的一者或多者的部分肽或完整肽。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、Flt3-L、SCF或IL-7。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,细胞因子是IL-21。在一些实施方案中,可将细胞因子与细胞因子的相应的受体一起施用。在一些实施方案中,将细胞因子与工程化g-NK细胞一起施用的步骤允许细胞因子信号传导,从而维持或改善NK细胞的细胞生长、增殖、扩增和/或效应子功能白介素白介素。

[0224] 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。

[0225] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-15或其功能部分。IL-15是调节NK细胞激活和增殖的细胞因子。在一些情况下,IL-15和IL-12共享类似的生物活性。例如,IL-15和IL-2结合共同的受体亚基,并且可竞争同一受体。在一些实施方案中,IL-15诱导JAK激酶的激活以及转录激活剂STAT3、STAT5和STAT6的磷酸化和激活。在一些实施方案中,IL-15促进或调节NK细胞的一种或多种功能活性,诸如促进NK细胞存活、调节NK细胞和T细胞的激活和增殖,以及支持NK细胞从造血干细胞发育。在一些实施方案中,功能部分是IL-15的保留全长或成熟IL-15的一种或多种功能(诸如促进NK细胞存活、调节NK细胞和T细胞的激活和增殖,以及支持NK细胞从造血干细胞发育)的一部分(例如含有全长IL-15的截短连续氨基酸序列)。可将IL-15的全部或功能部分施用给受试者。

[0226] 如本领域技术人员所理解的,多种IL-15分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-15是野生型IL-15。在一些方面,IL-15是哺乳动物IL-15(例如,智人白介素15(IL15),转录变体3,mRNA,NCBI参考序列:NM_000585.4;家犬白介素15(IL15),mRNA,NCBI参考序列:NM_001197188.1;家猫白介素15(IL15),mRNA,NCBI参考序列:NM_001009207.1)。“哺乳动物”或“哺乳类”的实例包括灵长类(例如,人)、犬科动物、猫科动物、啮齿动物、猪、反刍动物等。具体实例包括人、狗、猫、马、牛、绵羊、山羊、兔、豚鼠、大鼠和小鼠。在具体方面,哺乳动物IL-15是人IL-15。人IL-15氨基酸序列包括例如Genbank登记号:NR_751915.1、NP_000576.1、AAI00963.1、AAI00964.1、AAI00962.1、CAA71044.1、AAH18149.1、AAB97518.1、CAA63914.1和CAA63913.1白介素白介素白介素。

[0227] 在一些实施方案中,IL-15核苷酸序列在SEQ ID NO:9中所示,或者是与SEQ ID NO:9具有至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或者至少或至少约98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,IL-15是缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式。在一些实施方案中,IL-15具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或者至少或至少约98%序列同一性的序列。

[0228] 在一些实施方案中,IL-15分子是人IL-5的变体,例如具有对人IL-15氨基酸序列的一个或多个氨基酸改变,例如取代。在一些实施方案中,IL-15变体包括位置45、51、52或72处的突变,或由这些突变组成,例如US2016/0184399中所述。在一些实施方案中,IL-15变体包含N、S或L对D、E、A、Y或P中的一者的取代,或由这些取代组成。在一些实施方案中,突变选自L45D、L45E、S51D、L52D、N72D、N72E、N72A、N72S、N72Y或N72P(关于人IL-15的序列,SEQ ID NO:2)。

[0229] 在实施方案中,IL-15分子包含IL-15变体,例如具有一个或多个氨基酸取代的人IL-15多肽。在一些实施方案中,IL-15分子包含位置72处的取代,例如N对D的取代。在一个实施方案中,IL-15分子是SEQ ID NO:2的IL-15N72D多肽或是与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列(其具有IL-15Ra结合活性)。

[0230] 在一些实施方案中,IL-15与IL-15受体 α (IL15RA)一起施用,诸如在与它的复合物中或作为与它的融合体施用。IL15RA以非常高的亲和性特异性结合IL-15,并且能够独立于其他亚基结合IL-15。在一些方面,这种性质允许IL-15由一个细胞产生,由另一个细胞内吞,然后呈递给第三个细胞。在一些实施方案中,向受试者施用IL-15/IL-15Ra。在一些实施方案中,向受试者施用IL-15/IL-15R融合蛋白。在一些实施方案中,向受试者施用单链IL-

15/IL-15R融合蛋白。在一些实施方案中,IL-15/IL-15Ra是可溶性IL15Ra.IL15复合体(例如,Mortier E等人,JBC,2006;Bessard A,Mol.Cancer Ther.,2009;和Desbois M,J.Immunol.,2016)。

[0231] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能部分。在一些实施方案中,IL-2是细胞因子家族的成员,该家族还包括IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21。IL-2通过由三条链(称为 α 、 β 和 γ)组成的受体复合物进行信号传导。该细胞因子受体家族的所有成员共享 γ 链。类似于IL-15,IL-2促进B细胞进行免疫球蛋白的产生,并诱导NK细胞的分化和增殖。在适应性免疫响应中发现了IL-2与IL-15之间的主要差异。例如,IL-2是对外来病原体的适应性免疫所必需的,因为它是免疫记忆发展的基础。另一方面,IL-15是通过支持CD8记忆T细胞的存活来维持高度特异性T细胞响应所必需的。IL-2的全部或功能部分可表达为膜结合的多肽和/或分泌多肽。如本领域技术人员所理解的,多种IL-2分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-2是野生型IL-2。在一些方面,IL-2是哺乳动物IL-2。在一些实施方案中,IL-2是人IL-2。

[0232] 在一些实施方案中,IL-2是缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式。在一些实施方案中,IL-2具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或者至少或至少约98%序列同一性的序列。

[0233] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-21或其功能部分。IL-21结合至IL-21受体(IL-21R)和共受体(共同的 γ 链(CD 132))。已经在NK细胞、T细胞和B细胞上鉴定出了IL-21受体,表明IL-21作用于造血谱系细胞,特别是淋巴祖细胞和淋巴细胞。已经表明IL-21是细胞毒性T细胞和NK细胞的有效调节剂。(Parrish-Novak,等人Nature 408:57-63,2000;Parrish-Novak,等人,J.Leuk.Bio.72:856-863,2002;Collins等人,Immunol.Res.28:131-140,2003;Brady,等人J.Immunol.172:2048-58,2004)。

[0234] 如本领域技术人员所理解的,多种IL-21分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-21是野生型IL-21。在一些方面,IL-21是哺乳动物IL-21。在一个实施方案中,IL-21序列是人IL-21序列。人IL-21氨基酸序列包括例如Genbank登记号:AAU88182.1、EAX05226.1、CAI94500.1、CAJ47524.1、CAL81203.1、CAN87399.1、CAS03522.1、CAV33288.1、CBE74752.1、CBI70418.1、CBI85469.1、CBI85472.1、CBL93962.1、CCA63962.1、AAG29348.1、AAH66258.1、AAH66259.1、AAH66260.1、AAH66261.1、AAH66262.1、AAH69124.1和ABG36529.1。

[0235] 在一些实施方案中,IL-21是缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式。在一些实施方案中,IL-21具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3具有至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或者至少或至少约98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,IL-21具有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%、或者至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0236] 细胞因子(例如IL-2、IL-15或IL-21)氨基酸序列可包括成熟细胞因子的任何功能部分,例如成熟IL-2、成熟IL-15或成熟IL-15的任何功能部分。功能部分可以是包含其所属的白介素的连续氨基酸的任何部分,条件是该功能部分特异性结合至相应的白介素受体。

当关于白介素使用时,术语“功能部分”是指白介素的任何部分或片段,该部分或片段保留了其所属的白介素(亲本白介素)的生物活性。功能部分涵盖例如保留了特异性结合至相应的白介素受体、激活白介素的下游靶标和/或诱导免疫细胞(例如NK细胞)的分化、增殖(或死亡)和活性中的一者或多者的能力的白介素部分,其能力的程度与亲本白介素类似、相同或更高。白介素的功能部分的生物活性可使用本领域已知的测定法来测量。关于亲本白介素,功能部分可包括例如约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多的亲本成熟白介素的氨基酸序列。

[0237] 在根据所提供的实施方案的细胞因子或功能部分的范围内包括本文所述的白介素的功能变体。如本文所用,术语“功能变体”是指与亲本白介素具有基本或显著序列同一性或类似性的白介素,该功能变体保留了其原本的白介素的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的白介素(亲本白介素)的那些变体,这些变体保留了特异性结合至相应的白介素受体、激活白介素的下游靶标和/或诱导免疫细胞(例如NK细胞)的分化、增殖(或死亡)和活性中的一者或多者的能力,其能力的程度与亲本白介素类似、相同或更高。关于亲本白介素,功能变体可例如在氨基酸序列上与亲本白介素至少约80%、约90%、约95%、约99%或更多相同。

[0238] 功能变体可例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本白介素的氨基酸序列。另选地或附加地,功能变体可包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本白介素的氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本白介素序列相比,氨基酸取代(例如保守或非保守氨基酸取代)不干扰或抑制功能变体的生物活性。在一些实施方案中,氨基酸取代(例如保守或非保守氨基酸取代)可增强功能变体的生物活性,使得与亲本白介素相比,功能变体的生物活性增加。

[0239] 在一些实施方案中,白介素的一个或多个氨基酸取代是保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域已知的,并且包括这样的氨基酸取代,其中具有某些物理和/或化学性质的一种氨基酸被更换为具有相同或类似化学或物理性质的另一种氨基酸。例如,保守氨基酸取代可为:用酸性/带负电荷的极性氨基酸取代另一种酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、用具有非极性侧链的氨基酸取代另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、用碱性/带正电荷的极性氨基酸取代另一种碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如Lys、His、Arg等)、用具有极性侧链的不带电荷的氨基酸取代另一种具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、用具有 β 支化侧链的氨基酸取代另一种具有 β 支化侧链的氨基酸(例如,Ile、Thr和Val)、用具有芳香侧链的氨基酸取代另一种具有芳香侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等白介素。

[0240] 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。一种或多种细胞因子可在NK细胞之前、之后或基本上同时施用。在一些实例中,一种或多种细胞因子可在NK细胞之后施用。在一个具体实例中,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。在一些实施方案中,将一定剂量的所提供工程化g-NK细胞组合物和细胞因子或生长因子依序次施用。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,将一定剂量

的含有工程化g-NK细胞的细胞与细胞因子或生长因子同时施用。

2. 细胞毒性剂或淋巴清除疗法

[0241] 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,施用一定剂量的含有工程化g-NK细胞的细胞。

[0242] 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,诸如在开始施用含有工程化g-NK细胞的g-NK细胞组合物之前或同时施用。在一些实施方案中,淋巴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,淋巴清除疗法可包括施用氟达拉滨。

[0243] 在一些方面,用免疫耗竭(例如,淋巴耗竭)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,淋巴清除疗法包括环孢霉素和氟达拉滨的组合。

[0244] 此类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;通过调节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.December;3(12):668-681(2006)。

[0245] 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/或淋巴清除疗法的施用经由门诊病人递送进行。

[0246] 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、氟达拉滨或其组合。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、氟达拉滨或其组合。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、氟达拉滨或其组合。

[0247] 在一些实施方案中,用在20mg/kg与100mg/kg之间或在约20mg/kg与约100mg/kg之间,诸如在40mg/kg与80mg/kg之间或在约40mg/kg与约80mg/kg之间的剂量的环磷酰胺预处理受试者。在一些方面,用或用约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。

[0248] 在一些实施方案中,当淋巴耗竭剂包含氟达拉滨时,以在1mg/m²与100mg/m²之间或在约1mg/m²与约100mg/m²之间,诸如在以下剂量之间或在约以下剂量之间:10mg/m²与75mg/m²、15mg/m²与50mg/m²、20mg/m²与30mg/m²、或者24mg/m²与26mg/m²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25mg/m²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。

[0249] 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60mg/kg(约2g/m²)的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/m²氟达拉滨。

[0250] 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,淋巴清除包括以20mg/m²至40mg/m²或约20mg/m²至约40mg/m²受试者体表面积,任选地为或为约30mg/m²,每天施用氟达拉滨,持续2至4天,和/或以200mg/m²至400mg/m²或约200mg/m²至约400mg/m²受试者体表面积,任选地为或为约300mg/m²,每天施用环磷酰胺,持续2至4天。

[0251] 在一些实施方案中,淋巴清除疗法包括氟达拉滨和环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴清除疗法包括每天以30mg/m²或约30mg/m²受试者体表面积施用氟达拉滨,以及每天以300mg/m²或约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。

[0252] 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、氟达拉滨或其组合,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。

[0253] 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,32(7):689-702(2009);以及Herman等人,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。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。

III. 工程化Fc受体 γ 缺陷的自然杀伤细胞(g-NK细胞)

[0254] 所提供的实施方案涉及表达嵌合抗原受体(CAR)并缺乏FcR γ 表达的工程化自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的方法和用途。在一些实施方案中,工程化NK细胞缺乏FcR γ 表达的g-NK细胞。在一些实施方案中,通过观察NK细胞或NK细胞群体是否表达FcR γ ,可以检测NK细胞的g-NK细胞亚群,其中缺乏FcR γ 的细胞为g-NK。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。

[0255] 在一些情况下,g-NK细胞还可通过作为g-NK细胞的替代标记物的表面标记物来鉴定。如下文进一步描述的,还发现细胞表面标记物的某些组合与g-NK细胞表型(即缺少胞内FcR γ 表达或胞内FcR γ 表达方面存在缺陷的细胞)相关,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^{阳性}) 和/或NKG2A (NKG2A^{阳性}) 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^{阳性}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^{阳性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}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^{阳性}的g-NK细胞。在一些实施方案中,g-NK细胞具有CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阳性}的表面表型。在一些实施方案中,g-NK细胞还具有NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}的表面表型。在一些实施方案中,g-NK细胞还具有CD38^{阳性}的表面表型。在一些实施方案中,g-NK细胞还具有CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}的表面表型。

[0256] 在一些实施方案中,g-NK细胞被工程化以表达CAR。在一些实施方案中,CAR为融合蛋白,其通常包括胞外结构域(该胞外结构域包括抗原识别区)、跨膜结构域和内结构域。胞外结构域(即,抗原识别区或抗原结合结构域)和跨膜结构域可通过柔性连接子连接。内结构域可包括在胞内传播外部细胞刺激的胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包括1) 抗原结合结构域;2) 柔性连接子;3) 跨膜区域;和4) 和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR结合至靶抗原并在抗原结合时诱导细胞毒性。

[0257] 在一些实施方案中,工程化g-NK细胞可进一步表达一种或多种其他另外的异源蛋白剂。在一些实施方案中,工程化g-NK细胞还表达免疫调节剂,如细胞因子。在一些实施方案中,工程化g-NK细胞还表达可分泌的抗体。

[0258] 在一些实施方案中,免疫调节剂是能够调节NK细胞的免疫功能的药剂。在一些实施方案中,免疫调节剂可以是免疫激活剂。在其他实施方案中,免疫调节剂可以是免疫抑制剂。在一些实施方案中,免疫调节剂是外源性细胞因子,如白介素或其功能部分。下文将进一步描述CAR和免疫调节剂的示例性特征。

[0259] 在一些实施方案中,g-NK细胞可通过如第IV章节中所述的基因编辑被进一步工程化。

A. 嵌合抗原受体

[0260] 在所提供的实施方案中,g-NK细胞被遗传工程化以表达结合至感兴趣的抗原的抗原受体。在某些实施方案中,抗原受体为嵌合抗原受体(CAR)。抗原受体可结合至例如肿瘤特异性或肿瘤相关抗原或病原体抗原。因此,工程化抗原受体(例如CAR)为一种重组抗原受体,其旨在将某种抗原特异性引入NK细胞中。在一些实施方案中,抗原受体(诸如CAR)被稳定整合到g-NK细胞中。在其他实施方案中,抗原受体(例如CAR)被g-NK细胞瞬时表达。例如,g-NK细胞包括具有确定多肽序列的CAR,该确定多肽序列由外源性多核苷酸表达,该外源性多核苷酸已经引入免疫效应细胞中(瞬时或整合到基因组中)。在所提供的实施方案中,本文提供的包括抗原受体(例如CAR)的工程化NK细胞可用于免疫疗法,以靶向和破坏与疾病或病症相关联的细胞(例如癌细胞),该细胞表达由抗原受体(例如CAR)识别的靶抗原。

[0261] 在一些实施方案中,抗原受体为嵌合抗原受体(CAR)。CAR通常由核酸序列(多核苷酸)编码,该核酸序列包括前导序列、胞外靶向结构域(也称为胞外结构域);例如抗原结合结构域(诸如scFv)、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,

CAR为融合蛋白,其包括:胞外靶向结构域(胞外结构域),该胞外靶向结构域包括抗原识别或抗原结合结构域;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。胞外结构域和跨膜结构域可通过柔性连接子(也称为间隔子)连接。在一些实施方案中,抗原结合结构域(诸如来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv))识别靶抗原。在一些实施方案中,抗原结合结构域(例如scFv)经由间隔子连接或融合至跨膜结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包括基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。CAR融合蛋白的激活导致细胞激活,以响应scFv(或其他抗原结合结构域)对其靶标的识别。当细胞表达此类CAR时,它可识别并杀死表达靶抗原的靶细胞。这种性质使得表达CAR的细胞成为对于将细胞活性特异性靶向异常细胞(包括但不限于癌细胞)而言特别有吸引力的药剂。已经针对靶抗原(包括肿瘤相关抗原)开发了各种CAR,用于在各种免疫细胞(包括T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞)中表达,以介导针对表达该抗原的靶细胞的细胞毒性,并且免疫细胞可为本文公开的工程化g-NK细胞。

[0262] 在一些实施方案中,前导序列可为本文所述的信号肽序列中的任一种信号肽序列。示例性CD8 α 信号肽在SEQ ID NO:12中所示。示例性GM-CSFR α 信号肽在SEQ ID NO:13中所示。示例性IgK信号肽在SEQ ID NO:14中所示。示例性IgK信号肽在SEQ ID NO:43中所示。

[0263] 可在工程化NK细胞中表达任何种类的嵌合抗原受体,包括在国际PCT申请PCT/US2018/024650、PCT/IB2019/000141、PCT/IB2019/000181和/或PCT/US2020/020824、PCT/US2020,035752中描述的那些。

[0264] 在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域特异性结合至抗原。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域或靶向结构域来源于抗体分子,并且包括赋予CAR抗原特异性的来自抗体分子的一个或多个互补决定区(CDR)。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域为单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,scFv为人scFv。在某些实施方案中,scFv为人源化scFv。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域为Fab(其任选地被交联)。在某些实施方案中,胞外结合结构域为F(ab')₂。在某些实施方案中,前述分子中的任一种分子可包括在具有异源序列的融合蛋白中,以形成胞外抗原结合结构域。在某些实施方案中,通过用抗原-Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定scFv。

[0265] 在一些实施方案中,scFv包括由柔性连接子多肽分开的免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链分子的可变链部分。重链和轻链的顺序不受限制,可以颠倒。柔性多肽连接子允许重链和轻链彼此缔合并重构免疫球蛋白抗原结合结构域。在一些实施方案中,柔性连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,柔性连接子为Whitlow连接子,诸如SEQ ID NO:55中所示。合适地,轻链可变区包括三个CDR,并且重链可变区包括三个CDR。合适地,用于抗原结合靶向结构域的CDR来源于任何物种(例如,人、小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊)的抗体分子,并且CDR之间的构架区是人源化的或包括与人构架区至少85%、90%、95%或99%相同的序列。

[0266] 当CAR的靶向结构域包括scFv时,免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链通过各种长度的多肽连接子连接。合适地,多肽连接子包括多于或等于10个氨基酸的长度。合适地,多肽连接子包括多于10、15、20或25个氨基酸的长度。合适地,多肽连接子包括少于或等于30个氨基酸的长度。合适地,多肽连接子包括少于15、20、25或30个氨基酸的长度。合适地,多肽连接子在长度上包括在10与30个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子在长度上包括在10与25个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子在长度上包括在10与20个之间的氨基酸。合适

地,多肽连接子在长度上包括在10与15个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子在长度上包括在15与30个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子在长度上包括在20与30个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子在长度上包括在25与30个之间的氨基酸。合适地,多肽连接子包括亲水性氨基酸。合适地,多肽连接子由亲水性氨基酸组成。合适地,多肽连接子包括G₄S序列(GGGGS)。G₄S连接子允许连接子具有柔性和蛋白酶抗性。合适地,G₄S连接子在多肽连接子中连续重复1、2、3、4、5、6、7或8次。

[0267] 在某些实施方案中,抗原为肿瘤抗原。在某些实施方案中,抗原为病原体抗原,包括例如病毒抗原或细菌抗原。

[0268] 可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或蛋白印迹测定来确认靶向抗原的CAR的胞外抗原结合结构域(例如scFv或其类似物)的结合。这些测定中的每一者通常通过使用对感兴趣的复合物具有特异性的标记试剂(例如,抗体或scFv)来检测特别感兴趣的蛋白-抗体复合物的存在。例如,scFv可被放射性标记并用于放射免疫测定(RIA)(参见例如Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,1986年3月,其通过引用并入本文)。可通过诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方式或通过放射自显影来检测放射性同位素。在某些实施方案中,用荧光标记物标记CAR的胞外抗原结合结构域。荧光标记物的非限制性实例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite和ImKalamal)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus和YPet)。

[0269] 在某些实施方案中,抗原识别受体结合至肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。任何合适的肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原(例如,抗原肽)均可用于本文所述的实施方案中。该抗原可以是但不限于蛋白、非蛋白、新抗原、翻译后经修饰抗原、肽-MHC抗原和/或过表达的抗原。

[0270] 例如,肿瘤靶标包括但不限于CD38(多发性骨髓瘤);CD20(淋巴瘤);表皮生长因子受体(EGFR;非小细胞肺癌、上皮癌和神经胶质瘤);表皮生长因子受体的III型变体(EGFRvIII;成胶质细胞瘤);人表皮生长因子受体2(HER2;卵巢癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、结肠癌、骨肉瘤和髓母细胞瘤);间皮素(间皮瘤、卵巢癌和胰腺癌);前列腺特异性膜抗原(PSMA;前列腺癌);癌胚性抗原(CEA;胰腺癌、乳腺癌和结肠直肠癌);二唾液酸神经节苷脂2(GD2;成神经细胞瘤和黑素瘤);白介素-13Ra2(神经胶质瘤);磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(肝细胞癌);碳酸酐酶IX(CAIX;肾细胞癌);L1细胞粘附分子(L1-CAM;成神经细胞瘤、黑素瘤和卵巢癌);癌抗原125(CA 125;上皮性卵巢癌);CD133(成胶质细胞瘤和胆管癌);成纤维细胞激活蛋白(FAP;恶性胸膜间皮瘤);癌/睾丸抗原1B(CTAG1B;黑素瘤和卵巢癌);粘蛋白1(精囊癌);和叶酸受体-a(FR-a;卵巢癌)。

[0271] 肿瘤抗原的其他非限制性实例包括但不限于碳酸酐酶IX(CAIX)、癌胚性抗原(CEA)、CD8、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CLL1、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49c、CD49f、CD56、CD66c、CD73、CD74、CD104、CD133、CD138、CD123、CD142、CD44V6、巨细胞病毒(CMV)感染的细胞的抗原(例如,细胞表面抗原)、皮肤淋巴细胞相关抗原(CLA;P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)的一种特化糖型)、上皮糖蛋白-2(EGP2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2,3,4(erb-B2,3,4)、叶酸结合蛋白

(EBP)、胎儿乙酰胆碱受体 (AChR)、叶酸受体- α 、神经节苷脂G2 (GD2)、神经节苷脂G3 (GD3)、人表皮生长因子受体2 (HER2)、人端粒酶逆转录酶 (hTERT)、白介素-13受体亚基 α -2 (IL-13 α 2)、 κ -轻链、激酶插入结构域受体 (KDR)、Lewis Y (LeY)、LI细胞粘附分子 (L1CAM)、黑素瘤抗原家族A,1 (MAGE-A1)、粘蛋白16 (MUC16)、粘蛋白1 (MUC1)、间皮素 (MSLN)、ERBB2、MAGE A3、p53、MART1、GP100、蛋白酶3 (PR1)、酪氨酸酶、生存素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、癌-睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚胎抗原 (h5T4)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、ROR1、四跨膜蛋白8 (TSPAN8)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG-72)、血管内皮生长因子R2 (VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白 (WT-1)、细胞因子受体样因子2 (CRLF2)、BCMA、GPC3、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII和ERBB。

[0272] 在一些实施方案中,肿瘤抗原为CD19、ROR1、Her2、PSMA、PSCA、间皮素 (MSLN) 或CD20。在一些实施方案中,肿瘤抗原为CD19、CD20、CD33、MSLN或细胞因子受体样因子2 (CRLF2),它们在白血病或淋巴瘤上表达。在一些实施方案中,CAR结合选自Her2、EGFR、 α 叶酸受体、CEA、cMET、MUC2、间皮素或ROR1的靶抗原。在某个实施方案中,靶抗原为CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF 17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC 16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。在一些实施方案中,靶抗原为血癌相关抗原。例如,靶抗原可为CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF 17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0273] 用于结合到CAR中的多种抗原结合结构域是已知的。在一个非限制性实例中,用CD38特异性CAR对g-NK细胞进行工程化(参见例如W02018/104562)。

[0274] 在一些实施方案中,用双特异性CAR或多种不同的CAR对g-NK细胞进行工程化,其中CAR的亲合性是针对两种不同的配体/抗原的。双特异性CAR-NK可用于增加癌细胞上潜在结合位点的数量,或者另选地用于将癌细胞定位于其他免疫效应细胞,这些免疫效应细胞表达对NK-CAR具有特异性的配体。为了用于癌症疗法,双特异性CAR可结合至靶肿瘤细胞和效应细胞,例如T细胞、NK细胞或巨噬细胞。因此,例如在多发性骨髓瘤的情况下,双特异性CAR可结合T细胞抗原(例如CD3等)和肿瘤细胞标记物(例如CD38等)。双特异性CAR可另选地结合至两种不同的肿瘤细胞标记物,从而增加NK细胞对靶肿瘤细胞的总体结合亲和性。这可通过下调靶抗原中的一种靶抗原来降低癌细胞产生抗性的风险。在这种情况下,在多发性骨髓瘤中,一个实例是CAR同时结合至CD38和CS-1/SLAMF7两者。CAR适合靶向的另一种肿瘤细胞标记物是肿瘤上的“别吃我”型标记物,例如CD47。

[0275] 在一些实施方案中,工程化g-NK细胞可包括双特异性CAR或由相同NK细胞表达的多种CAR。这允许NK细胞同时靶向两种不同的抗原。合适地,双特异性CAR对以下抗原中的任两种抗原具有特异性:CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF 17/BCMA、CD123/IL3-RA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1、CD 123、HERV-K。合适地,CAR NK细胞的双特异性性质可允许结合至肿瘤抗原和另一种免疫细胞,诸如T细胞或树突细胞。合适地,CAR NK细胞的双特异性性质可允许结合至检查点抑制剂,诸如PDL-1或CD47。合适地,第一CAR具有CD38特异性,并且第二CAR对SLAMF-7、BCMA、CD138、CD229、PDL-1或CD47中的任一者具有特异性。合适地,第一CAR对CD38具有特异性,并且第二CAR对SLAMF-7、BCMA、CD138、

CD229具有特异性。合适地,第一CAR对CD38具有特异性,并且第二CAR对SLAMF-7具有特异性。合适地,第一CAR对CD38具有特异性,并且第二CAR对BCMA具有特异性。合适地,第一CAR对CD38具有特异性,并且第二CAR对CD 138具有特异性。合适地,第一CAR对CD38具有特异性,并且第二CAR对CD229具有特异性。

[0276] 在一些实施方案中,CAR的跨膜结构域包括疏水性氨基酸残基,并且允许CAR锚定到工程化NK细胞的细胞膜中。合适地,跨膜结构域包括来源于跨膜蛋白的氨基酸序列。合适地,跨膜结构域包括来源于T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD27、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD 137和CD 154的跨膜结构域的氨基酸序列。合适地,CAR包括具有来源于CD8的跨膜结构域的氨基酸序列的跨膜结构域。合适地,CAR包括具有来源于人CD8 α 的跨膜结构域的氨基酸序列的跨膜结构域。在一些实施方案中,CAR含有CD8 α 的跨膜结构域,其具有SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:61表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域在SEQ ID NO:61中所示。在一些实施方案中,CAR包含CD8 α 的跨膜结构域,其具有SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:73表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域在SEQ ID NO:73中所示。

[0277] 在一些实施方案中,合适地,CAR包含具有来源于CD28的跨膜结构域的氨基酸序列的跨膜结构域。合适地,CAR包含具有来源于人CD28的跨膜结构域的氨基酸序列的跨膜结构域。在一些实施方案中,CAR含有铰链结构域和CD28的跨膜结构域,其具有SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:39表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域在SEQ ID NO:39中所示。在一些实施方案中,CD28的跨膜结构域具有SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:74表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域在SEQ ID NO:74中所示。在一些实施方案中,CAR包含CD28铰链结构域和CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28铰链结构域和跨膜结构域以SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列示出。在一些实施方案中,CD28铰链结构域和跨膜结构域以SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列示出。

[0278] 在一些实施方案中,CAR还可包括位于抗原结合靶向结构域与跨膜结构域之间的间隔区。在一些实施方案中,间隔区包括亲水性氨基酸,并且允许靶向结构域相对于细胞表面具有柔性。合适地,间隔区包括多于5、10、15、20、25或30个氨基酸。合适地,间隔区包括少于10、15、20、25、30或35个氨基酸。在一些实施方案中,间隔区为铰链区,并且包括CD8或免疫球蛋白分子的铰链序列。

[0279] 在一些实施方案中,间隔区为或包括CD8铰链。在一些实施方案中,间隔子为人CD8的铰链区。在一些实施方案中,CAR含有CD8铰链间隔子序列,其具有SEQ ID NO:60中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:60表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子的序列在SEQ ID NO:60中所示。在一些实施方案中,CAR含有CD8铰链间隔子序列,其具有SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:71表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子序列在SEQ ID NO:71中所示。

[0280] 在一些实施方案中,间隔区是或包括CD28铰链。在一些实施方案中,间隔子区是人

CD28的铰链区。在一些实施方案中,CAR含有CD28铰链间隔子序列,其具有SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:72表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子的序列在SEQ ID NO:72中所示。

[0281] 在一些实施方案中,间隔区包括含有IgG1 Fc或IgG4 Fc的铰链结构域的全部或一部分。在一些实施方案中,间隔子为IgG4 Fc间隔子。在一些实施方案中,CAR含有IgG4Fc间隔子,其具有SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:38表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子的序列在SEQ ID NO:38中所示。在一些实施方案中,间隔子的序列为IgG1 Fc或IgG4 Fc的铰链部分。在一些实施方案中,CAR含有IgG4铰链间隔子。在一些实施方案中,IgG4铰链间隔子具有SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:59表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子的序列在SEQ ID NO:59中所示。在一些实施方案中,IgG4铰链间隔子具有SEQ ID NO:75中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:75表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子的序列在SEQ ID NO:75中所示。

[0282] 在一些实施方案中,CAR的胞内信号传导结构域增加了CAR的效力,并且包括来源于参与免疫细胞信号传导的蛋白的胞内信号传导结构域。合适地,一个或多个胞内信号传导结构域包括来源于CD3 ζ CD28、OX-40、4-1BB、DAP10、DAP 12、2B4(CD244)或它们的任何组合的胞内信号传导结构域。合适地,一个或多个胞内信号传导结构域包括来源于CD3 ζ CD28、OX-40、4-1BB、DAP10、DAP 12、2B4(CD244)或它们的任何组合中的任两者的胞内信号传导结构域。

[0283] 在一些实施方案中,CAR的内结构域可包括另外两个信号传导结构域。例如,CAR可包括主要胞内信号传导结构域(诸如CD3 ζ 胞内信号传导结构域),以及来自共刺激分子的胞内信号传导结构域,以向细胞提供附加信号,诸如以进一步增强表达CAR的免疫细胞的效力。因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)包括:1)抗原结合结构域;2)柔性连接子;3)跨膜区域;和4)胞内信号传导区,该胞内信号传导区包括第一主要胞内信号传导结构域(诸如CD3 ζ 胞内信号传导结构域)和第二共刺激胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域可为CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD30、CD40、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和/或B7-H3共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域可为CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、DAP10、DAP12、ICOS和/或2B4。在一些实施方案中,共刺激结构域可为CD27、CD28、4-1BB、2B4、DAP10、DAP12、OX40、CD30、CD40、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和/或B7-H3共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域是CD28的信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域为4-1BB的信号传导结构域。

[0284] 在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD3 ζ 的信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:41表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD3 ζ 的信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD3 ζ 的信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列或与SEQ ID

NO:50表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD3 ζ 的信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列。

[0285] 在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:40表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有的CD28共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域含有CD28的共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:52表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的或与SEQ ID NO:51表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR含有胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域,其具有SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列。

[0287] 在一些实施方案中,胞内信号传导结构域可以是CD3 ζ 、CD28和/或4-1BB的结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域(例如,SEQ ID NO:51或与SEQ ID NO:51表现出至少85%、90%或95%序列同一性的序列)和CD3 ζ 信号传导结构域(例如,SEQ ID NO:41或50或与SEQ ID NO:41或50表现出至少85%、90%或95%序列同一性的序列)。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域(例如,SEQ ID NO:52或与SEQ ID NO:52表现出至少85%、90%或95%序列同一性的序列)和CD3 ζ 信号传导结构域(例如,SEQ ID NO:41或50或与SEQ ID NO:41或50表现出至少85%、90%或95%序列同一性的序列)。

[0288] 合适地,CAR包含来源于CD3 ζ 和4-1BB的至少两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:51中所示的序列。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中所示的序列。

[0289] 在其他实施方案中,合适地,CAR包含来源于CD3 ζ 和CD28的至少两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:40中所示的序列的。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:52中所示的序列。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:40中所示的序列。在一些实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:52中所示的序列。

[0290] 在一些实施方案中,抗原受体(例如CAR)由编码具有NH₂末端前导序列的CAR的多核苷酸编码。前导序列(也称为信号肽)允许表达的CAR构建体进入内质网(ER)并靶向细胞表面。前导序列在ER中被切割,并且成熟细胞表面CAR不具有前导序列。通常,前导序列长度

将在5至30个氨基酸的范围内,并且包括一段疏水性氨基酸。合适地,前导序列在长度上包括多于5、10、15、20或25个氨基酸。合适地,前导序列在长度上包括少于10、15、20、25或30个氨基酸。合适地,前导序列包括来源于任何分泌蛋白的序列。合适地,前导序列包括来源于CD8 α 前导序列的序列。在一些实施方案中,合适地,前导序列包括来源于IgK前导序列的序列。在一些实施方案中,前导序列在SEQ ID NO:43中所示。

[0291] 在一些实施方案中,CAR为存在于多种已知的工程化细胞产物中的任一种产物中的CAR。CAR可包括但不限于被工程化到细胞中的CAR:ABECMA[®]、JCARH125、CARVYKTI[™] (NJ-68284528;Janssen/Legend)、P-BCMA-101 (Poseida)、PBCAR269A (Poseida)、P-BCMA-Allol (Poseida)、Allo-715 (Pfizer/Allogene)、CT053 (Carsgen)、Descartes-08 (Cartesian)、PHE885 (Novartis)、CTX120 (CRISPR Therapeutics); YESCARTA[®]、KYMRIAH[®]、TECARTUS[®]或BREYANZI[®]。

[0292] 在一些实施方案中,CAR包括商业CAR细胞疗法的CAR。商业上基于细胞的疗法中的CAR的非限制性实例包括在细胞中工程化的CAR:brexucabtagene autoleucel (TECARTUS[®])、axicabtagene ciloleucel (YESCARTA[®])、idecabtagene vicleucel (ABECMA[®])、ciltacabtagene autoleucel (CARVYKTI[™])、lisocabtagene maraleucel (BREYANZI[®])、tisagenlecleucel (KYMRIAH[®])。

[0293] 在一些实施方案中,用结合至CD19的CAR对g-NK细胞进行工程化。分化簇19 (CD 19) 是一种可在白血病前体细胞上检测到的抗原决定簇。人和鼠的氨基酸和核酸序列可在公共数据库中找到,诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot。例如,人CD19的氨基酸序列可以UniProt/Swiss-Prot登记号P15391找到,并且编码人CD19的核苷酸序列可以登记号NM_001178098找到。CD19在大多数B谱系癌症中表达,包括例如急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤。它也是B细胞祖细胞的早期标记物。参见例如Nicholson等人,Mol. Immun. 34 (16-17):1157-1165 (1997)。本文公开的CAR多肽中的抗原结合胞外结构域对CD19 (例如,人CD19) 具有特异性。在一些实例中,抗原结合胞外结构域可包括能够结合至CD 19的scFv胞外结构域。在一些实施方案中,抗CD19 CAR可包括对CD19具有特异性的抗CD19单链可变片段 (scFv),随后是融合至胞内共信号传导结构域 (例如,CD28或4-1BB) 和CD3 ζ 信号传导结构域的间隔子和跨膜结构域。

[0294] 在一些实施方案中,CD19 CAR的胞外结合结构域可包括SEQ ID NO:54中所示的重链可变区 (V_H) 和SEQ ID NO:53中所示的轻链可变区 (V_L)。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow连接子。在一些实施方案中,scFv具有SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv具有SEQ ID NO:58中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子为CD8铰链,诸如SEQ ID NO:60中所示。在一些实施方案中,间隔子为IgG4铰链,诸如SEQ ID NO:59中所示。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高

的序列同一性,并且保留与CD19的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0295] 在一些实施方案中,CAR包括商业CAR细胞疗法的抗CD19 CAR。商业上基于细胞的疗法中的抗CD19 CAR的非限制性实例包括在细胞中工程化的抗CD19 CAR:YESCARTA[®]、KYMRIAH[®]、TECARTUS[®]或BREYANZI[®]。

[0296] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:76表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:76表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。

[0297] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:77表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:77表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:77中所示的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。

[0298] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:78表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:78表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。

[0299] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:79中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:79表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR,其具有SEQ ID NO:79中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:79中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:79表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。在一些实施方案中,抗CD19 CAR是由编码SEQ ID NO:79中所示的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。

[0300] CD20已被证明是血液系统恶性肿瘤(诸如B-NHL)的治疗靶标,并得到了经批准和广泛使用的单克隆抗体疗法的支持。此外,CD19、CD20和CD22抗原在恶性B细胞上的普遍存在使得它们成为细胞疗法的完美靶标。在一些实施方案中,CAR含有结合至CD20的胞外抗原结合结构域。在具体实施方案中,CD20 CAR包括针对CD20的CAR,其中该针对CD20的CAR包括单链Fv抗体或抗体片段(scFv)。在一些实施方案中,抗CD20CAR可包括对CD20具有特异性的抗CD20单链可变片段(scFv),随后是融合至胞内共信号传导结构域(例如,CD28或4-1BB)和CD3 ζ 信号传导结构域的间隔子和跨膜结构域。在一些实施方案中,CAR含有抗CD20 scFv,随后是IgG4-Fc间隔子、CD28跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR为Leu16 CAR,如Rufener等人Cancer Immunol.Res.2016 4:509-519。也参见GenBank登录号#KX055828。

[0301] 在一些实施方案中,CD20 CAR的胞外结合结构域可包括SEQ ID NO:36中所示的重

链可变区 (V_H) 和SEQ ID NO:35中所示的轻链可变区 (V_L)。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为GS接头,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的接头为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow接头。在一些实施方案中,抗CD20 scFv在SEQ ID NO:37中所示。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与CD20的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv和IgG4 Fc间隔子(例如SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(例如SEQ ID NO:39)、CD28共刺激信号传导结构域(例如SEQ ID NO:40)和CD3 ζ 信号传导结构域(例如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,CD20CAR具有SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:42表现出至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,CD20 CAR具有SEQ ID NO:42中所示的序列。在一些实施方案中,CAR由SEQ ID NO:45中所示的多核苷酸(例如mRNA)编码。

[0302] 在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:37中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0303] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞外结合结构域可包含SEQ ID NO:81中所示的重链可变区 (V_H) 和SEQ ID NO:80中所示的轻链可变区 (V_L)。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是GS接头,例如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是Whitlow接头,例如SEQ ID NO:55中所示。在一些实施方案中,抗CD20 scFv如SEQ ID NO:82中所示。在一些实施方案中,例如本文中所述,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,例如本文中所述,胞内信

号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,应当理解,CAR任何以下序列:其对其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更多的序列同一性,并保留与CD20的结合以及细胞内信号转导和细胞毒性活性。

[0304] 在某些实施方案中,抗CD20 CAR含有SEQ ID NO:82中所示的scFv、IgG4 Fc间隔子(如SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、CD28共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:40)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:82中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,应当理解,CAR任何以下序列:其对其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0305] 在一些实施方案中,CAR包含与CD22结合的胞外抗原结合结构域。在一个具体的实施方案中,CD22 CAR包括定向CD22的CAR,其中定向CD22的CAR包含单链Fv抗体或抗体片段(scFv)。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外抗原结合结构域来源于对CD22具有特异性的抗体,如m971、SM03、伊诺珠单抗(inotuzumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、莫西妥珠单抗(moxetumomab)和皮那妥珠单抗(pinatuzumab)。在这些实施方案中的任何实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域可包括任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR或由其组成。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域包括SEQ ID NO:84中所示的重链可变区(V_H)和SEQ ID NO:85中所示的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是GS接头,例如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是Whitlow接头,例如SEQ ID NO:55中所示。在一些实施方案中,抗CD22 scFv在SEQ ID NO:86中所示。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域包括SEQ ID NO:87中所示的重链可变区(V_H)和SEQ ID NO:88中所示的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是GS接头,例如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分离VH和VL的接头是Whitlow接头,例如SEQ ID NO:55中所示。在一些实施方案中,抗CD22 scFv在SEQ ID NO:89中所示。

[0306] 在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、IgG4 Fc间隔子(如SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、CD28共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:40)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:86中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,应当理解,CAR任何以下序列:其对其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0307] 在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、IgG4 Fc间隔子(如SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、CD28共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:40)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD8跨膜结构域(如SEQ ID NO:73)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、CD8铰链间隔子(如SEQ ID NO:71)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、CD28铰链间隔子(如SEQ ID NO:72)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:89中所示的scFv、IgG4铰链间隔子(如SEQ ID NO:59或75)、CD28跨膜结构域(如SEQ ID NO:39)、4-1BB共刺激信号传导结构域(如SEQ ID NO:51)和CD3 ζ 信号传导结构域(如SEQ ID NO:41)。在一些实施方案中,应当理解,CAR任何以下序列:其对其对任何上述或所描述的

SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0308] 在一些实施方案中,抗CD22 CAR可包含对CD22具有特异性的抗CD22单链可变片段(scFv),随后的间隔子和跨膜结构域,所述跨膜结构域与胞内共信号传导结构域(如CD28或4-1BB)和CD3 ζ 信号传导结构域融合。在一些实施方案中,CAR包含抗CD22 scFv,随后的IgG4-Fc间隔子、CD28跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0309] 在一些实施方案中,用结合至BCMA的CAR对g-NK细胞进行工程化。人们已经在多发性骨髓瘤细胞和其他淋巴瘤中普遍检测到BCMA RNA,并且若干研究者已经在来自多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面上检测到BCMA蛋白(参见例如Novak等人,Blood,103(2):689-694,2004;Neri等人,Clinical Cancer Research,73(19):5903-5909,2007;Bellucci等人,Blood,105(10):3945-3950,2005;和Moreaux等人,Blood,703(8):3148-3157,2004)。用于靶向BCMA的CAR是已知的,并且包括但不限于在美国专利号10,934,363或WO 2018/028647中描述的那些。在一些实施方案中,CAR含有结合至BCMA的胞外抗原结合结构域。在具体实施方案中,BCMACAR包括针对BCMA的CAR,其中该针对BCMA的CAR包括单链Fv抗体或抗体片段(scFv)。在一些实施方案中,抗BCMACAR可包括对BCMA具有特异性的抗BCMA单链可变片段(scFv),随后是融合至胞内共信号传导结构域(例如,CD28或4-1BB)和CD3 ζ 信号传导结构域的间隔子和跨膜结构域。

[0310] 在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包括来源于C11D5.3(一种鼠单克隆抗体)的scFv,如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)中所述。也参见PCT申请公开号W02010/104949。来源于C11D5.3的scFv可包括C11D5.3的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,VH具有SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列,并且VL具有SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow连接子。在一些实施方案中,scFv具有SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与BCMA的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0311] 在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包括来源于另一种鼠单克隆抗体C12A3.2的scFv,如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)和PCT申请公开号W02010/104949中所述。在一些实施方案中,VH具有SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列,并且VL具有SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow连接子。在一些实施方案中,scFv具有SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID

NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与BCMA的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0312] 在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包括对人BCMA具有高特异性的鼠单克隆抗体,其在Friedman等人, *Hum. Gene Ther.* 29(5):585-601 (2018) 中称为BB2121。也参见PCT申请公开号W02012163805。BB2121也称为抗BCMA02 CAR。在一些实施方案中,VH具有SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列,并且VL具有SEQ ID NO:69中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开VH和VL的连接子为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow连接子。在一些实施方案中,scFv具有SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与BCMA的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0313] 在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包括两条重链(VHH)的单一可变片段,这些片段可结合至BCMA的两个表位,如Zhao等人, *J. Hematol. Oncol.*, 11(1):141 (2018) 中所述,并且也称为LCAR-B38M。也参见PCT申请公开号W02018/028647。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与BCMA的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0314] 在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包括全人重链可变结构域(FH VH),如Lam等人, *Nat. Commun.* 11(1):283 (2020) 中所述,其也称为FHVH33。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与BCMA的结合以及胞内信号传导和细胞毒活性。

[0315] 在一些实施方案中,CAR是抗BCMACAR,其具有SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:83表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR是BCMACAR,其具有SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗BCMACAR是由编码SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:83表现出至少85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。在一些实施方案中,抗BCMACAR是由编码SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列的核苷酸序列编码的。

[0316] 在一些实施方案中,CAR包括商业CAR细胞疗法的抗BCMACAR。商业上基于细胞的治疗方法中的抗BCMACAR的非限制性实例包括在细胞中工程化的抗BCMACAR:idecabtagene

vicleucel(ABECMA[®])或ciltacabtagene autoleucel(CARVYKTI[™])。

[0317] 在一些实施方案中,抗原是GPCR5D。在一些实施方案中,scFv含有V_H和V_L,其来源于对GPCR5D具有特异性的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,结合GPCR5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开公开号W0 2016/090329、W0 2016/090312和W0 2020/092854中所示的抗体或抗体片段的V_H和V_L,其中各内容均通过引用以其整体并入本文。

[0318] 在一些实施方案中,抗原是FcRL5。在一些实施方案中,scFv含有V_H和V_L,其来源于对FcRL5具有特异性的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,结合FcRL5的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开公开号W0 2016/090337和W0 2017/096120中所示的抗体或抗体片段的V_H和V_L,其中各内容均通过引用以其整体并入本文。

[0319] CD38(分化簇38),也称为环ADP核糖水解酶,是一种在许多免疫细胞(白细胞),特别是T细胞,包括CD4⁺、CD8⁺、B淋巴细胞和自然杀伤细胞的表面上发现的糖蛋白。CD38还在细胞粘附、信号传导和钙信号传导中发挥作用。关于该蛋白的结构信息可在UniProtKB/Swiss-Prot数据库中找到,参考号为P28907。在人体中,CD38蛋白由位于4号染色体上的CD38基因编码。CD38是一种多功能胞外酶,其催化环ADP-核糖(cADPR)从NAD⁺到ADP-核糖的合成和水解。这些反应产物被认为是胞内Ca²⁺调节所必需的。而且,CD38机能的丧失与免疫响应受损和代谢紊乱相关联(Malavasi F.,等人(2008).“Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology”.*Physiol.Rev.*88(3):841-86)。CD38蛋白是HIV感染、白血病、骨髓瘤、实体瘤、II型糖尿病和骨代谢的标记物。CD38表达是B细胞慢性淋巴细胞白血病的重要预后因素。*Blood* 98:181-186)。在一些实施方案中,抗CD38 CAR可包括对CD38具有特异性的抗CD38单链可变片段(scFv),随后是融合至胞内共信号传导结构域(例如,CD28或4-1BB)和CD3 ζ 信号传导结构域的间隔子和跨膜结构域。

[0320] 在一些实施方案中,CD38 CAR的胞外结合结构域可包括SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47中所示的重链可变区(V_H)和SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49中所示的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,scFv中分开V_H和V_L的连接子为GS连接子,诸如SEQ ID NO:56中所示。在一些实施方案中,scFv中分开V_H和V_L的连接子为SEQ ID NO:55中所示的Whitlow连接子。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域含有CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,诸如本文所述的任一种。在一些实施方案中,应当理解,CAR包括任何以下序列:其对任何上述或所描述的SEQ ID NO表现出一些序列变异,诸如与其具有至少85%、90%、95%或更高的序列同一性,并且保留与CD38的结合以及胞内信号传导和细胞毒性。

B. 免疫调节剂(如细胞因子)

[0321] 在所提供的实施方案中,工程化g-NK细胞或多种g-NK细胞被工程化,以表达异源免疫调节剂,诸如外源性细胞因子,例如白介素。在一些实施方案中,编码免疫调节剂的异源核酸被稳定整合到g-NK细胞的基因组中。在其他实施方案中,编码免疫调节剂的异源核酸被瞬时表达。在一些实施方案中,免疫调节剂是免疫抑制剂。在其他实施方案中,免疫调节剂是免疫激活剂。在一些实施方案中,免疫激活剂是细胞因子。

[0322] 在所提供的实施方案中,工程化NK细胞表达异源细胞因子或其功能部分。根据所

提供的实施方案,在一些实施方案中,NK细胞被工程化,以表达分泌形式的细胞因子,而在一些实施方案中,细胞因子是膜结合的。在一些实施方案中,异源细胞因子或其功能部分可从细胞分泌。在一些实施方案中,异源细胞因子或其功能部分表达为细胞表面上的膜结合蛋白。

[0323] 细胞因子是在细胞信号传导中,特别是在免疫系统环境中起重要作用的一大类蛋白。已经表明细胞因子作为免疫调节剂在自分泌、旁分泌和内分泌信号传导中发挥作用。细胞因子可作为免疫激活剂起作用,从而刺激免疫介导的响应,或作为免疫抑制剂起作用,从而减弱免疫介导的响应。细胞因子包括趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子,但通常不包括激素或生长因子。

[0324] 在一些实施方案中,细胞因子是白介素。白介素是一组细胞因子,通常是介导广泛的免疫应答的分泌蛋白和信号分子。例如,白介素(IL)-2在调节白细胞活性中发挥作用,而白介素(IL)-15通过调节先天免疫系统和适应性免疫系统的细胞活性而在对微生物入侵者和寄生虫的炎性和保护性免疫响应的发展中发挥主要作用。在一些实施方案中,NK细胞(包括所提供的g-NK细胞)的一种或多种活性由IL-2、IL-21和/或IL-15或所描述的另一种细胞因子调节。

[0325] 由于细胞因子是NK细胞活性所必需的,因此典型的方法涉及将外源性细胞因子作为外源性细胞因子支持物与NK细胞疗法组合施用给受试者。然而,在一些方面,外源性细胞因子的施用可能导致全身毒性的风险,特别是高剂量施用某些细胞因子时可能会发生这种情况。在所提供的实施方案中,用可分泌细胞因子或膜结合细胞因子对NK细胞进行工程化为NK细胞提供了细胞因子的本地来源,同时避免或降低了全身毒性的风险。

[0326] 在所提供的工程化细胞的一些实施方案中,将白介素或其功能部分引入g-NK细胞中或g-NK细胞群体中。在一些实施方案中,白介素包括由免疫细胞诸如淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞产生的细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是免疫激活细胞因子(也称为免疫激活剂),其可用于诱导NK细胞来诸如促进NK细胞存活、激活和/或增殖。例如,某些细胞因子(诸如IL-15或IL-21)可防止或减少NK细胞经历衰老,诸如通过提高它们体外或体内扩增的能力来实现。在一些实施方案中,白介素或其功能部分是IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-18或IL-21中的一者或多者的部分肽或完整肽。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、Flt3-L、SCF或IL-7。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能部分。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12或其功能部分。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15或其功能部分。在一些实施方案中,细胞因子是IL-21或其功能部分。在一些实施方案中,可将细胞因子与细胞因子的相应的受体一起引入。在一些实施方案中,将异源细胞因子工程化到工程化细胞中的步骤允许细胞因子信号传导,从而维持或改善NK细胞的细胞生长、增殖、扩增和/或效应子功能,但降低了细胞因子毒性的风险。在一些实施方案中,引入的细胞因子或在一些情况下还有其相应的细胞因子受体在细胞表面上表达。在一些实施方案中,细胞因子信号传导是组成型激活的。在一些实施方案中,细胞因子信号传导的激活是诱导型的。在一些实施方案中,细胞因子信号传导的激活是瞬时的或暂时的。

[0327] 示例性可分泌和膜结合的(mb)细胞因子是已知的,如例如以下各项中所述:专利公开号US2017/0073638;US2020/0199532、US2021/0024959;和PCT专利公开号

WO2015174928、WO 2019/126748、WO 2019/191495、WO2020056045、WO2021021907、WO 2021/011919、WO 2021/062281,这些专利公开中的任一者均可用于所提供的工程化细胞中。

[0328] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-15或其功能部分。IL-15是调节NK细胞激活和增殖的细胞因子。在一些情况下,IL-15和IL-12共享类似的生物活性。例如,IL-15和IL-2结合共同的受体亚基,并且可竞争同一受体。在一些实施方案中,IL-15诱导JAK激酶的激活以及转录激活剂STAT3、STAT5和STAT6的磷酸化和激活。在一些实施方案中,IL-15促进或调节NK细胞的一种或多种功能活性,诸如促进NK细胞存活、调节NK细胞和T细胞的激活和增殖,以及支持NK细胞从造血干细胞发育。在一些实施方案中,功能部分是IL-15的保留全长或成熟IL-15的一种或多种功能(诸如促进NK细胞存活、调节NK细胞和T细胞的激活和增殖,以及支持NK细胞从造血干细胞发育)的一部分(例如含有全长IL-15的截短连续氨基酸序列)。IL-15的全部或功能部分可表达为膜结合多肽和/或分泌多肽。

[0329] 如本领域技术人员所理解的,多种IL-15分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-15是野生型IL-15。在一些方面,IL-15是哺乳动物IL-15(例如,智人白介素15(IL15),转录变体3,mRNA,NCBI参考序列:NM_000585.4;家犬白介素15(IL15),mRNA,NCBI参考序列:NM_001197188.1;家猫白介素15(IL15),mRNA,NCBI参考序列:NM_001009207.1)。“哺乳动物”或“哺乳类”的实例包括灵长类(例如,人)、犬科动物、猫科动物、啮齿动物、猪、反刍动物等。具体实例包括人、狗、猫、马、牛、绵羊、山羊、兔、豚鼠、大鼠和小鼠。在具体方面,哺乳动物IL-15是人IL-15。人IL-15氨基酸序列包括例如Genbank登记号:NR_751915.1、NP_000576.1、AAI00963.1、AAI00964.1、AAI00962.1、CAA71044.1、AAH18149.1、AAB97518.1、CAA63914.1和CAA63913.1。

[0330] 在一些实施方案中,工程化NK细胞包含编码IL-15的异源核苷酸序列。在一些实施方案中,IL-15核苷酸序列在SEQ ID NO:9中所示,或者是与SEQ ID NO:9具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%、或者至少为或至少为约98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,IL-15由细胞以缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式表达。在一些实施方案中,IL-15具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或者至少或至少约98%序列同一性的序列。

[0331] 在一些实施方案中,IL-15分子是人IL-15的变体,例如具有对人IL-15氨基酸序列的一个或多个氨基酸改变,例如取代。在一些实施方案中,IL-15变体包括位置45、51、52或72处的突变,或由这些突变组成,例如US2016/0184399中所述。在一些实施方案中,IL-15变体包括N、S或L对D、E、A、Y或P中的一者的取代,或由这些取代组成。在一些实施方案中,突变选自L45D、L45E、S51D、L52D、N72D、N72E、N72A、N72S、N72Y或N72P(关于人IL-15的序列,SEQ ID NO:2)。

[0332] 在实施方案中,IL-15分子包括IL-15变体,例如具有一个或多个氨基酸取代的人IL-15多肽。在一些实施方案中,IL-15分子包括位置72处的取代,例如N对D的取代。在一个实施方案中,IL-15分子为SEQ ID NO:2的IL-15多肽(其中含有氨基酸取代N72D),或者是与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列(其具有IL-15Ra结合活性)。

[0333] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能部分。在一些实施方案中,IL-2是细

胞因子家族的成员,该家族还包括IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21。IL-2通过由三条链(称为 α 、 β 和 γ)组成的受体复合物进行信号转导。该细胞因子受体家族的所有成员共享 γ 链。类似于IL-15,IL-2促进B细胞进行免疫球蛋白的产生,并诱导NK细胞的分化和增殖。在适应性免疫响应中发现了IL-2与IL-15之间的主要差异。例如,IL-2是对外来病原体的适应性免疫所必需的,因为它是免疫记忆发展的基础。另一方面,IL-15是通过支持CD8记忆T细胞的存活来维持高度特异性T细胞响应所必需的。IL-2的全部或功能部分可表达为膜结合多肽和/或分泌多肽。如本领域技术人员所理解的,多种IL-2分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-2是野生型IL-2。在一些方面,IL-2是哺乳动物IL-2。在一些实施方案中,IL-2是人IL-2。

[0334] 在一些实施方案中,工程化NK细胞包含编码IL-2的异源核苷酸序列。在一些实施方案中,IL-2由细胞以缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式表达。在一些实施方案中,IL-2具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%、或者至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0335] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-21或其功能部分。IL-21结合至IL-21受体(IL-21R)和共受体(共同的 γ 链(CD 132))。已经在NK细胞、T细胞和B细胞上鉴定出了IL-21受体,表明IL-21作用于造血谱系细胞,特别是淋巴祖细胞和淋巴细胞。已经表明IL-21是细胞毒性T细胞和NK细胞的有效调节剂。(Parrish-Novak,等人Nature 408:57-63,2000; Parrish-Novak,等人,J.Leuk.Bio.72:856-863,202;Collins等人,Immunol.Res.28:131-140,2003;Brady,等人J.Immunol.172:2048-58,2004.)。在鼠的研究中,IL-21增强NK细胞的成熟和效应子功能(Kasaian等人,Immunity 16:559-569,2002)。

[0336] 如本领域技术人员所理解的,多种IL-21分子的序列是本领域已知的。在一个方面,IL-21是野生型IL-21。在一些方面,IL-21是哺乳动物IL-21。在一个实施方案中,IL-21序列是人IL-21序列。人IL-21氨基酸序列包括例如Genbank登记号:AAU88182.1、EAX05226.1、CAI94500.1、CAJ47524.1、CAL81203.1、CAN87399.1、CAS03522.1、CAV33288.1、CBE74752.1、CBI70418.1、CBI85469.1、CBI85472.1、CBL93962.1、CCA63962.1、AAG29348.1、AAH66258.1、AAH66259.1、AAH66260.1、AAH66261.1、AAH66262.1、AAH69124.1和ABG36529.1。

[0337] 在一些实施方案中,工程化NK细胞包含编码IL-21的异源核苷酸序列。在一些实施方案中,IL-21由细胞以缺少信号肽序列并且在一些情况下也缺少前肽序列的成熟形式表达。在一些实施方案中,IL-21具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%、或者至少为或至少为约98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,IL-21具有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%、或者至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0338] 细胞因子(例如IL-2、IL-15或IL-21)氨基酸序列可包括成熟细胞因子的任何功能部分,例如成熟IL-2、成熟IL-15或成熟IL-21的任何功能部分。功能部分可以是包含其所属的白介素的连续氨基酸的任何部分,条件是该功能部分特异性结合至相应的白介素受体。当关于白介素使用时,术语“功能部分”是指白介素的任何部分或片段,该部分或片段保留

了其所属的白介素(亲本白介素)的生物活性。功能部分涵盖例如保留了特异性结合至相应的白介素受体、激活白介素的下游靶标和/或诱导免疫细胞(例如NK细胞)的分化、增殖(或死亡)和活性中的一者或多者的能力的白介素部分,其能力的程度与亲本白介素类似、相同或更高。白介素的功能部分的生物活性可使用本领域已知的测定法来测量。关于亲本白介素,功能部分可包括例如约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多的亲本成熟白介素的氨基酸序列。

[0339] 在根据所提供的实施方案的细胞因子或功能部分的范围内包括本文所述的白介素的功能变体。如本文所用,术语“功能变体”是指与亲本白介素具有基本或显著序列同一性或类似性的白介素,该功能变体保留了其原本的白介素的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的白介素(亲本白介素)的那些变体,这些变体保留了特异性结合至相应的白介素受体、激活白介素的下游靶标和/或诱导免疫细胞(例如NK细胞)的分化、增殖(或死亡)和活性中的一者或多者的能力,其能力的程度与亲本白介素类似、相同或更高。关于亲本白介素,功能变体可例如在氨基酸序列上与亲本白介素至少约80%、约90%、约95%、约99%或更多相同。

[0340] 功能变体可例如包括具有至少一个保守氨基酸取代的亲本白介素的氨基酸序列。另选地或附加地,功能变体可包括具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本白介素的氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本白介素序列相比,氨基酸取代(例如保守或非保守氨基酸取代)不干扰或抑制功能变体的生物活性。在一些实施方案中,氨基酸取代(例如保守或非保守氨基酸取代)可增强功能变体的生物活性,使得与亲本白介素相比,功能变体的生物活性增加。

[0341] 在一些实施方案中,白介素的氨基酸取代是保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域已知的,并且包括这样的氨基酸取代,其中具有某些物理和/或化学性质的一种氨基酸被更换为具有相同或类似化学或物理性质的另一种氨基酸。例如,保守氨基酸取代可为:用酸性/带负电荷的极性氨基酸取代另一种酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、用具有非极性侧链的氨基酸取代另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、用碱性/带正电荷的极性氨基酸取代另一种碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如Lys、His、Arg等)、用具有极性侧链的不带电荷的氨基酸取代另一种具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、用具有 β 支化侧链的氨基酸取代另一种具有 β 支化侧链的氨基酸(例如,Ile、Thr和Val)、用具有芳香侧链的氨基酸取代另一种具有芳香侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0342] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)可由g-NK细胞以多种方式表达为分泌多肽。例如,细胞因子的全部或功能部分可在NK细胞内表达并从NK细胞分泌。在一些实施方案中,可分泌细胞因子不含跨膜结构域。

[0343] 在一些实施方案中,细胞因子可从工程化g-NK细胞分泌。在一些实施方案中,可分泌细胞因子被组成型表达。在其他实施方案中,可分泌细胞因子被瞬时表达。在一些实施方案中,可分泌细胞因子处于诱导型启动子之下。在一些实施方案中,可分泌细胞因子是IL-2或其功能部分。在一些实施方案中,IL-2的氨基酸序列是或包括SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,可分泌细胞因子是IL-15或其功能部分。在一些实施方案中,IL-15的氨基酸序列是

或包括SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,可分泌细胞因子是IL-21或其功能部分。在一些实施方案中,IL-21的氨基酸序列为或包括SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,用两种或更多种可分泌细胞因子(诸如IL-2、IL-15和IL-21中的两者或更多者的组合)对g-NK细胞进行工程化。

[0344] 尽管白介素和其他细胞因子通常是分泌的,但它们也可以是膜结合的。当与CAR融合蛋白共表达时,则有可能将免疫细胞激活细胞因子和CAR融合蛋白集中在靶细胞附近。当在g-NK细胞中与CAR融合蛋白共表达时,g-NK细胞显示出提高的靶向和杀伤能力,因此代表一种有吸引力并且有效的治疗剂。

[0345] 在其他实施方案中,细胞因子是膜结合的(mb)。在一些实施方案中,膜结合细胞因子被组成型表达。在其他实施方案中,膜结合细胞因子被瞬时表达。在一些实施方案中,膜结合细胞因子处于诱导型启动子之下。在一些实施方案中,膜结合细胞因子是膜结合IL-2(mbIL-2)。在一些实施方案中,膜结合细胞因子是膜结合IL-15(mbIL-15)。在一些实施方案中,膜结合细胞因子是膜结合IL-21(mbIL-21)。在一些实施方案中,用两种或更多种膜结合细胞因子(诸如mbIL-2、mbIL-15和mbIL-21中的两者或更多者的组合)对g-NK细胞进行工程化。膜结合细胞因子可包括以膜结合形式格式化的任何格式化的白介素细胞因子(例如,IL-2、IL-15或IL-21),诸如本文所述的任一种。

[0346] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)可由g-NK细胞以多种方式表达为膜结合细胞因子。在一些实施方案中,可使用本领域已知的多种连接子中的任一种连接子将细胞因子或其功能部分直接或间接(例如,离子、非离子、共价键)连接(例如,缀合或融合)至g-NK细胞的表面(例如,在NK细胞的表面处或膜内)(Hermanson,G.,Bioconjugate Techniques,Academic Press,1996)。在一些方面,将细胞因子的全部或功能部分连接至跨膜蛋白的全部或一部分。在一个方面,NK细胞表达融合蛋白,该融合蛋白包括融合至跨膜蛋白的全部或一部分的细胞因子的全部或一部分。在一些实施方案中,连接子可为肽连接子,诸如柔性连接子。在一些实施方案中,柔性连接子主要包括甘氨酸和丝氨酸残基。例如,柔性连接子可包括G4S和G3S中的一者或两者的一个或多个重复(例如,G4S和G3S的约3至约15或约5至约12个重复)。在一些实施方案中,连接子为可切割连接子,诸如弗林蛋白酶可切割序列。示例性弗林蛋白酶切割序列描述于Duckert等人,Protein Engineering,Design&Selection,17(1):107-112(2004)和美国专利8,871,906中,它们中的每一者通过引用并入本文。

[0347] 在具体方面,跨膜蛋白的部分包括跨膜蛋白的跨膜结构域的全部或一部分。在一些实施方案中,跨膜蛋白可为位于膜上和/或膜内的任何蛋白,该膜为诸如生物膜(例如细胞膜等生物膜)的磷脂双层。在一些实施方案中,跨膜结构域为通常在膜内存在的跨膜蛋白的结构域,特别是形成通道和孔的那些。在一些实施方案中,跨膜结构域为在膜(例如,囊泡的膜,诸如细胞的膜)中热力学稳定的三维蛋白结构。跨膜结构域的实例包括单个 α 螺旋、若干跨膜 α 螺旋的稳定复合物、跨膜 β 桶、短杆菌肽A的 β 螺旋或任何其他结构。跨膜螺旋通常长约20个氨基酸。

[0348] 跨膜蛋白的实例包括受体、配体、免疫球蛋白、血型糖蛋白或它们的组合。跨膜蛋白的具体实例包括但不限于CD8 α 、CD4、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD28、CD137、Fc ϵ RI γ 、T细胞受体(TCR,诸如TCR α 和/或TCR β)、烟碱乙酰胆碱受体、GABA受体或其组合。免疫球蛋白的

具体实例包括IgG、IgA、IgM、IgE、IgD或其组合。血型糖蛋白的具体实例包括血型糖蛋白A、血型糖蛋白D或其组合。

[0349] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。CD28跨膜结构域连同CD28铰链结构域的示例性序列在SEQ ID NO:10中所示。

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVR
(SEQ ID NO:10)

[0350] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域是CD8跨膜结构域。CD8跨膜结构域连同CD8铰链结构域的示例性序列在SEQ ID NO:11中所示。

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLLSLVITLYC(SEQ ID NO:11)

[0351] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域是CD4跨膜结构域。CD4跨膜结构域的示例性序列在SEQ ID NO:15所示。

MALIVLGGVAGLLFFIGLGIFF(SEQ ID NO:15)

[0352] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)可连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如报告基因)或它们的任何组合。

[0353] 在一些实施方案中,编码细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)的核酸序列被编码来自异源蛋白的信号肽的核酸序列代替。异源蛋白可为例如CD8 α 、CD28、组织纤溶酶原激活物(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如IgE或IgK)。

[0354] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)融合至CD8 α 的信号肽。示例性CD8 α 信号肽在SEQ ID NO:12中所示。在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-15或其功能部分、IL-2或其功能部分或IL-21或其功能部分)融合至GM-CSFRa的信号肽(SEQ ID NO:13)。示例性GM-CSFRa信号肽在SEQ ID NO:13中所示。示例性IgK信号肽在SEQ ID NO:14中所示。示例性IgK信号肽在SEQ ID NO:43中所示。

[0355] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)融合至CD8 α 的信号肽和CD8 α 的跨膜结构域的全部或一部分。在一些实施方案中,异源细胞因子是SEQ ID NO:7中所示的膜结合IL-15或与SEQ ID NO:7具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%或至少为或至少为约98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,异源细胞因子是SEQ ID NO:8中所示的膜结合IL-15或与SEQ ID NO:8具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%或至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0356] 在一些实施方案中,细胞因子的全部或功能部分(例如IL-2、IL-15、IL-21或前述各项中任一者的功能部分)融合至免疫球蛋白的Fc区,以生成二价细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子-Fc融合蛋白可进一步连接至跨膜结构域,以作为膜结合细胞因子表达。

[0357] 在一些实施方案中,异源细胞因子是SEQ ID NO:5中所示的膜结合IL-15或与SEQ ID NO:5具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%或至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0358] 在一些实施方案中,异源细胞因子是SEQ ID NO:6中所示的膜结合IL-21或与SEQ ID NO:6具有至少为或至少为约85%、至少为或至少为约90%、至少为或至少为约95%或至少为或至少为约98%序列同一性的序列。

[0359] 在一些实施方案中,将IL-15和IL-15受体 α (IL15RA)一起工程化到细胞中。IL15RA以非常高的亲和性特异性结合IL-15,并且能够独立于其他亚基结合IL-15。在一些方面,这种性质允许IL-15由一个细胞产生,由另一个细胞内吞,然后呈递给第三个细胞。在一些实施方案中,g-NK细胞表达异源(例如外源性)IL-15/IL-15Ra。在一些实施方案中,用IL-15/IL-15R融合蛋白对g-NK细胞进行工程化。在一些实施方案中,用单链IL-15/IL-15R融合蛋白对g-NK细胞进行工程化。在一些实施方案中,IL-15/IL-15Ra表达为膜结合IL-15. IL15Ra复合物(例如Imamura等人,Blood,2014 124(7):108和Hurton LV等人,PNAS,2016)。在一些实施方案中,外源性IL-15/IL-15Ra是可分泌的,并且表达为可溶性IL15Ra. IL15复合物(例如Mortier E等人,JBC,2006年;Bessard A,Mol.Cancer Ther.,2009年;和Desbois M,J.Immunol.,2016年)。在一些实施方案中,所提供的工程化g-NK细胞表达膜结合IL15/IL15Ra复合物和可溶性(可分泌的)IL15Ra/IL15复合物。在一些实施方案中,工程化g-NK细胞表达具有可切割连接子的膜结合形式的IL15. IL15Ra复合物。

C. 多核苷酸

[0360] 在一些实施方案中,本文提供了具有编码抗原受体(诸如嵌合抗原受体,包括所提供的嵌合抗原受体中的任一种嵌合抗原受体)的核酸序列的多核苷酸。在一些实施方案中,本文提供了具有编码所提供的免疫调节剂(诸如细胞因子,包括可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)中的任一种免疫调节剂的核酸序列的多核苷酸。

[0361] 在一些实施方案中,编码抗原受体(诸如嵌合抗原受体)的核酸和编码免疫调节剂(诸如细胞因子,包括可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的核酸作为单独的多核苷酸提供。

[0362] 在一些实施方案中,多核苷酸包含编码抗原受体(诸如嵌合抗原受体)的核酸序列和编码免疫调节剂(诸如细胞因子,包括可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的核酸。因此,在一些方面,核酸序列作为同一多核苷酸的一部分提供。例如,所提供的实施方案包括这样的多核苷酸,其中工程化组分由包括一个或多个蛋白酶切割位点的多核苷酸编码,该蛋白酶切割位点例如为自切割肽,诸如T2A、P2A、E2A或F2A。此类位点被蛋白酶识别和切割,这可导致由工程化到NK细胞中的多核苷酸编码的各种组分部分(例如细胞因子和CAR)的分离(和单独表达)。因此,根据实施方案,工程化组分的各种组成部分可在单个载体中或通过多个载体递送至NK细胞。

[0363] 本文还提供了编码所提供的多核苷酸中的任一种多核苷酸的媒介物,其诸如用于将多核苷酸递送至细胞,例如g-NK细胞。在一些实施方案中,媒介物是载体,诸如病毒载体或非病毒载体。在一些实施方案中,媒介物是作为慢病毒载体的病毒载体。在一些实施方案中,媒介物是脂质体。在一些实施方案中,媒介物是脂质纳米颗粒。其他媒介物(包括载体或非载体递送媒介物)包括本领域技术人员已知的那些,包括下文所述的任何媒介物。

[0364] 在一些实施方案中,根据所提供的方法,将多核苷酸工程化到g-NK细胞或含有多种g-NK细胞的组合物中。以下描述了对NK细胞进行工程化的示例性方法。

D. 异源药剂的递送方法

[0365] 在一些实施方案中,如本文提供的工程化g-NK细胞,包括用于所提供方法的工程化g-NK细胞,可以通过将CAR基因工程化至g-NK细胞中而产生。在一些实施方案中,基因工程化的方法包括将编码CAR的核酸引入g-NK细胞中。在一些实施方案中,可将一种或多种其他异源蛋白药剂(如细胞因子免疫调节剂)工程化至细胞中,这可与将CAR工程化至g-NK细胞中同时或按任意顺序依次进行。引入g-NK细胞中的核酸可为了稳定整合到基因组中而引入,也可为了瞬时表达而引入。可基于多种因素选择稳定整合或瞬时表达,这些因素包括但不限于特定核酸有效整合到宿主基因组中的能力或核酸的含量及其半衰期。

[0366] 在一些实施方案中,将异源药剂引入g-NK细胞中(如CAR)可在从NK细胞的起始样本富集g-NK细胞亚群的方法中进行。因此,应当理解,所提供的方法不需要特别地仅对已针对FcR γ 链缺陷的NK细胞选择的g-NK细胞(或仅对已通过g-NK替代标记物谱选择或鉴定的g-NK细胞)进行工程化,而是可涉及对将要或已经优先扩增g-NK细胞或富含g-NK细胞的NK细胞组合物的细胞进行工程化。因此,富含g-NK细胞的最终细胞组合物包括引入了异源抗原受体(例如CAR)和免疫调节剂(诸如细胞因子)(例如可分泌白介素或膜结合白介素,诸如IL-15或IL-21)的g-NK细胞。第VI章节中提供了制备和扩增富含g-NK细胞的组合物的示例性方法。

[0367] 在一些实施方案中,可在扩增g-NK细胞的方法期间的任何合适时间进行异源药剂(例如CAR)的引入,诸如在第VI章节中所述。在一些实施方案中,在从受试者选择细胞(例如选择或富集CD3^{阴性}CD57^{阳性}或CD3^{阴性}CD56^{阳性}的细胞)之后并且在将所选择或富集的细胞与饲养细胞(例如表达HLA-E的饲养细胞)一起温育或培养以进行NK细胞的增殖或扩增之前进行引入。在一些实施方案中,在与饲养细胞(例如表达HLA-E的饲养细胞)一起温育或培养并且因此在此在所选择或富集的细胞已经增殖或扩增之后进行引入。在一些实施方案中,引入与本文所述的用于基因编辑的方法以任何顺序依次进行。

[0368] 在一些实施方案中,细胞的扩增期(诸如在第VI章节中所描述的)被分成第一次扩增和第二次扩增。在一些实施方案中,在引入(例如,病毒转导)之前,将来自生物样本的所选择的细胞在扩增条件下培养第一时间段,例如培养以下时间段或培养以下时间段以上:约6小时、约12小时、约18小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天或所列出的这些时间之间的任何时间(包括端点)。在一些实施方案中,在第一次扩增期之后,将编码一种或多种异源药剂(诸如所述的嵌合抗原受体)的工程化构建体引入(例如转导到)扩增的细胞(例如NK细胞)中。在引入(例如,病毒转导)之后,将工程化细胞培养第二时间段,例如培养以下时间段或培养以下时间段以上:约6小时、约12小时、约18小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天或所列出的这些时间之间的任何时间(包括端点)。

[0369] 可在培养过程中的任何时间用表达HLA-E的饲养细胞和/或一种或多种刺激剂(诸如IL12和/或IL21)补充培养基。例如,可在培养开始时添加一种或多种刺激剂,例如在时间点0(例如,培养开始)时添加。一种或多种药剂可添加第二次、第三次、第四次、第五次或更多次。随后的添加可与先前添加的浓度相同或不同。多次添加之间的间隔可变化,例如约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约72小时或更长的时间间隔,以及其间的任何时间

(包括端点)。如果多次添加刺激剂,则第一次补充添加的浓度可与第二次(和/或任何补充添加)的浓度相同或不同。例如,在若干实施方案中,在多个时间点进行的刺激剂添加的浓度可逐渐上升、逐渐下降、保持恒定或在多个非等同浓度之间变化。

[0370] 在一些实施方案中,在g-NK细胞中瞬时表达的条件下引入编码异源药剂(诸如CAR)的核酸。在一些实施方案中,用于引入核酸进行瞬时表达的方法包括将会产生核酸的任何方法,该核酸可在降解之前短时间内表达其编码内容物。

[0371] 在一些实施方案中,在g-NK细胞中稳定表达的条件下引入编码异源药剂(诸如CAR)的核酸。在一些实施方案中,用于引入核酸以在细胞中进行稳定表达的方法涉及任何这样的方法:该方法导致核酸稳定整合到细胞的基因组中,使得如果核酸所整合的细胞分裂,则核酸可增殖。

[0372] 递送多核苷酸和含有该多核苷酸的组合物的方法是本领域技术人员已知的。本领域技术人员能够选择用于在细胞中进行瞬时表达或稳定表达的适当方法。

[0373] 在一些实施方案中,NK细胞的工程化可通过用编码异源药剂(如CAR)的多核苷酸或包括所述多核苷酸的载体转导细胞组合物来完成。载体可为病毒载体,诸如慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、重组AAV、腺病毒载体或溶瘤病毒载体。在其他方面,非病毒载体例如纳米颗粒和脂质体也可用于将编码异源药剂(如CAR)的多核苷酸引入和递送至NK细胞中。

[0374] 在一些实施方案中,包装编码异源药剂(的多核苷酸的载体可用于将经包装的多核苷酸递送至g-NK细胞或富含g-NK细胞的细胞组合物或群体。这些载体可为任何种类,包括DNA载体、RNA载体、质粒、病毒载体和颗粒。病毒载体技术是为人熟知的,并且在Sambrook等人(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)中有所描述。可用作载体的病毒包括但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、单纯疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、溶瘤病毒等。

[0375] 通常,载体含有至少一个生物体内的复制功能起点、启动子序列和适宜的限制性内切核酸酶位点以及一个或多个选择性标记物,例如药物抗性基因。

[0376] 启动子可包括启动多核苷酸序列的特异性转录所需的、由细胞的转录机器识别的任何DNA序列。载体可包括可操作地连接至多核苷酸的天然或非天然启动子。所选择的启动子可以是强、弱、组成型、诱导型、组织特异性、发育阶段特异性和/或生物体特异性的。合适的启动子的一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作地连接的多核苷酸序列的高水平表达。启动子的另一个实例为延伸生长因子-1. α (EF-1. α)。还可使用其他组成型启动子,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、禽白血病病毒启动子、埃-巴二氏病毒立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒启动子,以及人基因启动子,其包括但不限于磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子、泛素C(Ubc)启动子、人U6小核蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在一些情况下,可使用诱导型启动子,诸如但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0377] 可使用附加启动子元件(例如增强子)来调节转录起始的频率。此类区域可位于起始位点上游或下游10至100个碱基对处。在一些情况下,可使用两个或更多个启动子元件来协同或独立地激活转录。

[0378] 在一些实施方案中,多核苷酸可包装到病毒载体中或整合到病毒基因组中,从而允许多核苷酸的瞬时表达或稳定表达。病毒载体可包括逆转录病毒载体,该逆转录病毒载体包括慢病毒载体。为了构建逆转录病毒载体,将编码异源药剂的多核苷酸分子插入病毒基因组中替代某些病毒序列,以产生复制缺陷型病毒。然后将重组病毒载体引入含有gag、pol和env基因但没有LTR和包装组分的包装细胞系中。重组逆转录病毒颗粒分泌到培养基中,然后收集,任选地浓缩,并用于基因转移。慢病毒载体是特别优选的,因为它们能够感染分裂细胞和非分裂细胞两者。

[0379] 在一些实施方案中,将编码异源药剂(如CAR)的多核苷酸并入到病毒载体中,以通过转导进行递送。病毒转导是通过病毒介导的手段将核酸故意引入真核细胞中的过程。

[0380] 在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。慢病毒载体是用于成功进行病毒转导的特别适用的手段,因为它们允许所递送的核酸转录物内含有的基因进行稳定表达。慢病毒载体表达逆转录酶和整合酶,这两种酶是所递送的核酸转录物内含有的基因进行稳定表达所需的。逆转录酶将RNA转录物转化成DNA,而整合酶将DNA插入并整合到靶细胞的基因组中。一旦DNA已经稳定整合到基因组中,它就与宿主一起分裂。整合的DNA中所含有的感兴趣的基因可组成型表达,或者它可以是诱导型的。作为宿主细胞基因组的一部分,它可能受到细胞调节的影响,包括激活或抑制,这取决于靶细胞中的许多因素。

[0381] 慢病毒是逆转录病毒科病毒的亚组,因为在整合到宿主基因组中之前需要将病毒RNA基因组逆转录成DNA而得名。因此,慢病毒媒介物/颗粒最重要的特征是它们的遗传物质整合到靶细胞/宿主细胞的基因组中。慢病毒的一些实例包括人类免疫缺陷病毒:HIV-1和HIV-2、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、杰姆布拉纳病毒(Jembrana Disease Virus)(JDV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、马传染性贫血病毒、梅迪-维斯纳病毒(visna-maedi)和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0382] 通常,构成基因递送媒介物的慢病毒颗粒本身是复制缺陷型的(也称为“自失活”)。由于通过完整宿主核包膜的进入机制,慢病毒能够感染分裂细胞和非分裂细胞两者(Naldini L等人,Curr.Opin.Bioiecknol,1998年,第9卷:第457-463页)。已经通过多次减毒HIV毒力基因生成了重组慢病毒媒介物/颗粒,例如,基因Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef和Tat缺失,使得载体在生物学上是安全的。对应地,慢病毒媒介物,例如来源于HIV-1/HIV-2的慢病毒媒介物可介导转基因向非分裂细胞中的有效递送、整合和长期表达。

[0383] 慢病毒颗粒可通过在生产细胞诸如人HEK293T细胞中共表达病毒包装元件和载体基因组本身来生成。这些元件通常以三个单独的质粒(在第二代慢病毒系统中)或四个单独的质粒(在第三代慢病毒系统中)提供。用编码慢病毒组分的质粒共转染生产细胞,该慢病毒组分包括病毒的核心(即结构蛋白)和酶组分以及包膜蛋白(称为包装系统),还用编码基因组(其包括待转移至靶细胞的外源转基因)的质粒共转染生产细胞,该基因组为媒介物本身(也称为转移载体)。通常,质粒或载体包括在生产细胞系中。经由转染、转导或感染将质粒/载体引入生产细胞系中。转染、转导或感染的方法是本领域技术人员熟知的。作为非限制性实例,可通过磷酸钙转染、脂质转染或电穿孔将包装和转移构建体引入生产细胞系中,通常与显性选择标记物,诸如新霉素(neo)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、谷氨酰胺合成酶或腺苷脱氨酶(ADA)一起引入,然后在适当药物的存在下进行选择并分离克隆。

[0384] 生产细胞产生含有外源基因的重组病毒颗粒,该外源基因为例如编码异源药剂的

多核苷酸。从培养基中回收重组病毒颗粒,并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。重组慢病毒媒介物可用于感染靶细胞,诸如g-NK细胞或富含g-NK细胞的细胞组合物或群体。

[0385] 可用于产生高滴度慢病毒颗粒的细胞可包括但不限于HEK293T细胞、293G细胞、STAR细胞(Relander等人,Mol Ther.2005,11:452-459)、FreeStyle™293表达系统(ThermoFisher,Waltham,MA),和其他基于HEK293T的生产细胞系(例如Stewart等人,Hum Gene Ther._2011,2,2.(3):357~369;Lee等人,Biotechnol Bioeng,2012,10996):1551-1560;Throm et al.,Blood.2009,113(21):5104-5110)。

[0386] 在一些方面,包膜蛋白可为来自其他病毒的异源包膜蛋白,诸如水泡性口炎病毒(VSV G)的G蛋白或杆状病毒gp64包膜蛋白。VSV-G糖蛋白尤其可选自分类为水泡病毒属的种类:Carajas病毒(CJSV)、Chandipura病毒(CHPV)、Cocal病毒(COCV)、Isfahan病毒(ISFV)、Maraba病毒(MARAV)、Piry病毒(PIRYV)、水泡性口炎Aiaogoas病毒(VSAV)、水泡性口炎印第安纳病毒(VSTV)和水泡性口炎新泽西病毒(VSNJV),和/或临时分类为水泡病毒属的种类,如草蜢弹状病毒、BeAn 157575病毒(BeAn 157575)、Boteke病毒(BTKV)、Calchaqui病毒(CQFV)、美洲鳗病毒(EVA)、Gray Lodge病毒(GLOV)、Jurona病毒(JURY)、Klamath病毒(KLAVj.Kwatta病毒(KWAV)、La Joya病毒(LJV)、Malpais Spring病毒(MSPV)、埃尔贡山蝙蝠病毒(MEB V)、Ferine t病毒(PERV)、梭子鱼鱼苗弹状病毒(PFRV)、Porton病毒(PORV)、Radi病毒(RADIV)、鲤鱼春季病毒血症病毒(SVCV)、Tupaia病毒(TUPV)、溃疡性疾病弹状病毒(UDRV)和Yug Bogdanovac病毒(YBV)。gp64或其他杆状病毒env蛋白可来源于苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)、芹菜夜蛾核型多角体病毒、家蚕核型多角体病毒、云杉芽卷蛾(Choristoneura fiimiferana)核型多角体病毒、黄杉合毒蛾(Orgyia pseudotsugata)单衣壳核型多角体病毒、苹果褐卷蛾(Epiphyas postvittana)核型多角体病毒、美国白蛾(Hypharitria cunea)核型多角体病毒、大蜡螟核型多角体病毒、Dhori病毒、Thogoto病毒、柞蚕(Antheraea pemyi)核型多角体病毒或Batken病毒。

[0387] 慢病毒颗粒中提供的附加元件可包括位于5'或3'末端的逆转录病毒LTR(长末端重复)、逆转录病毒输出元件、任选的慢病毒反向响应元件(RRE)、启动子或其活性部分以及基因座控制区(LCR)或其活性部分。其他元件包括提高非分裂细胞中的转导效率的中央多嘌呤束(cPPT)序列、增强转基因的表达并增加滴度的土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调节元件(WPRE)。

[0388] 生成重组慢病毒颗粒的方法是本领域技术人员已知的,例如在美国专利号8,846,385、7,745,179、7,629,153、7,575,924、7,179,903和6,808,905中有所描述。所使用的慢病毒载体可选自但不限于pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer2Q、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL和pLionII。也可使用任何已知的慢病毒媒介物(参见美国专利号9,260,725、9,068,199、9,023,646、8,900,858、8,748,169、8,709,799、8,420,104、8,329,462、8,076,106、6,013,516和5,994,136;国际专利公开号:W02012079000)。

[0389] 其他逆转录病毒载体也可用于包装编码异源药剂的核酸以递送至g-NK细胞或富含g-NK细胞的细胞组合物或群体中。逆转录病毒载体(RV)允许转基因在靶细胞中永久整合。除了基于复合HIV-1/2的慢病毒载体之外,基于简单 γ 逆转录病毒的逆转录病毒载体也

已经广泛用于递送治疗基因,并且在临床上被证明是能够转导广泛的细胞类型的最有效和最强大的基因递送系统之一。 γ 逆转录病毒的实例种类包括鼠白血病病毒 (MLV) 和猫白血病病毒 (FeLV)。

[0390] 在一些实施方案中,来源于哺乳动物 γ 逆转录病毒诸如鼠白血病病毒 (MLV) 的 γ 逆转录病毒载体是重组的。MLV 科的 γ 逆转录病毒包括亲嗜性、双嗜性、嗜异性和多变性亚科。亲嗜性病毒仅能够使用 mCAT-1 受体感染鼠细胞。亲嗜性病毒的实例为莫洛尼 MLV 和 AKV。双嗜性病毒通过 Pit-2 受体感染鼠、人和其他物种。双嗜性病毒的一个实例为 4070A 病毒。嗜异性和多变性病毒利用相同的 (Xpr1) 受体,但它们的物种嗜性不同。嗜异性病毒诸如 NZB-9-1 感染人和其他物种,但不感染鼠物种,而多变性病毒诸如病灶形成病毒 (MCF) 感染鼠、人和其他物种。

[0391] γ 逆转录病毒载体可通过用若干质粒共转染细胞而在包装细胞中产生,这些质粒包括编码逆转录病毒结构多蛋白和酶多蛋白 (gag-pol) 的质粒、编码包膜 (env) 蛋白的质粒和编码载体 mRNA 的质粒,该载体 mRNA 包括待包装在新形成的病毒颗粒中的编码异源药剂的多核苷酸。

[0392] 在一些方面,重组 γ 逆转录病毒载体被来自其他病毒的包膜蛋白假型化。包膜糖蛋白被结合到病毒颗粒的外脂质层中,这可增加/改变细胞嗜性。示例性包膜蛋白包括长臂猿白血病病毒包膜蛋白 (GALV) 或水泡性口炎病毒 G 蛋白 (VSV-G),或猿猴内源性逆转录病毒包膜蛋白,或麻疹病毒 H 和 F 蛋白,或人类免疫缺陷病毒 gp120 包膜蛋白,或 coxal 水泡病毒包膜蛋白 (参见例如美国专利申请公开号:2012/164118)。在其他方面,包膜糖蛋白可被遗传修饰,以将靶向/结合配体结合到 γ 逆转录病毒载体中,结合配体包括但不限于肽配体、单链抗体和生长因子 (Waehier 等人, Nat. Rev. Genet. 2007, 8(8):573-587)。这些工程化糖蛋白可将载体重新靶向表达其对应靶部分的细胞。在其他方面,可引入“分子桥”,以将载体导向特定细胞。分子桥具有双重特异性:一端可识别病毒糖蛋白,而另一端可结合至靶细胞上的分子决定簇。此类分子桥 (例如配体-受体、抗生物素蛋白-生物素和化学缀合物、单克隆抗体和工程化膜融合蛋白) 可引导病毒载体与靶细胞的附着以进行转导 (Yang 等人, Biotechnol Bioeng., 2008, 101(2):357-368; 和 Maetzig 等人, Viruses, 2011, 3, 677-713)。

[0393] 在一些实施方案中,重组 γ 逆转录病毒载体是自失活 (SIN) γ 逆转录病毒载体。载体可以是无复制能力的。SIN 载体可在原本包括增强子/启动子活性的 3'U3 区内具有缺失。此外,5'U3 区可用来源于巨细胞病毒或 RSV 的强启动子 (在包装细胞系中需要) 或选择的内部启动子和/或增强子元件代替。内部启动子的选择可根据特定目的所需的基因表达的特定要求来进行。

[0394] 在一些实施方案中,将编码异源药剂 (的多核苷酸插入重组病毒基因组中。重组 γ 逆转录病毒载体的病毒 mRNA 的其他组分可通过插入或删除天然存在的序列来修饰 (例如,插入 IRES、插入编码感兴趣的多肽或抑制性核酸的异源多核苷酸、从不同的逆转录病毒或病毒改组更有效的启动子来代替野生型启动子等)。在一些实例中,重组 γ 逆转录病毒载体可包括经修饰包装信号,和/或引物结合位点 (PBS),和/或 5'-长末端重复 (LTR) 的 U3 区中的 5'-增强子/启动子元件,和/或 3-LTR 的 US 区中经修饰的 3'-SIN 元件。这些修饰可增加滴度和感染能力。适于递送异源药剂的 γ 逆转录病毒载体可选自美国专利号:8,828,718、7,585,676、7,351,585;美国专利申请公开号:US2007/048285;PCT 申请公开号:W02010/

113037、W02014/121005、W02015/056014;和EP专利号:EP1757702、EP1757703中公开的那些载体。

[0395] 在一些实施方案中,可将编码异源药剂的多核苷酸包装到重组腺相关病毒(rAAV)载体中。此类载体或病毒颗粒可设计成利用任何已知的血清型衣壳或血清型衣壳的组合。血清型衣壳可包括来自任何已鉴定的AAV血清型及其变体的衣壳,例如AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAVrh10。在一些实施方案中,AAV血清型可为或具有以下各文献中描述的序列:美国公开号US20030138772;Pulicherla等人,Molecular Therapy,2011,第19卷第6期:第1070-1078页;美国专利号:6,156,303;7,198,951;美国专利公开号:US2015/0159173和US2014/0359799;和国际专利公开号:W01998/011244、W02005/033321和W02014/14422。

[0396] AAV载体不仅包括单链载体,还包括自互补AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有退火在一起形成双链载体基因组的DNA。通过跳过第二链合成,scAAV允许在细胞中快速表达。rAAV载体可通过本领域的标准方法制造,诸如通过在sf9昆虫细胞中或在人细胞(诸如HEK293细胞)的悬浮细胞培养物中进行三重转染。

[0397] 在一些实施方案中,可使用基于非病毒的方法。例如,在一些方面,包括多核苷酸的载体可通过非病毒方法用以下方法转移至细胞中:物理方法,诸如针头、电穿孔、声穿孔、水穿孔;化学载体,诸如无机颗粒(例如磷酸钙、二氧化硅、金)和/或化学方法。在其他方面,合成或天然生物可降解药剂可用于递送,诸如阳离子脂质、脂质纳米乳液、纳米颗粒、基于肽的载体或基于聚合物的载体。

[0398] 在一些实施方案中,编码异源药剂(如CAR)的多核苷酸被设计为用于递送的信使RNA(mRNA)。

[0399] 在一些实施方案中,将编码异源药剂的多核苷酸(诸如mRNA)并入脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中,制剂为可包括至少一种脂质的纳米颗粒。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG和PEG化脂质。在另一个方面,脂质可为阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC 3-DMA、DLin-KC2-DMA和DODMA。

[0400] 脂质纳米颗粒可用于递送经包封的或缔合的(例如复合的)治疗剂,包括mRNA。特别地,一些纳米颗粒组合物特别适用于递送核酸,包括信使RNA(mRNA)、反义寡核苷酸、质粒DNA、微小RNA(miRNA)、miRNA抑制剂(拮抗剂/对映体)、干扰信使RNA的互补RNA(micRNA)、DNA、多价RNA、dicer底物RNA、互补DNA(cDNA)和自扩增RNA(saRNA)。参见例如美国专利号10,723,692B2。

[0401] 因此,本文提供的方法包括用于将编码异源药剂(如CAR)的核酸(包括DNA、RNA、mRNA和自扩增RNA(saRNA))递送至g-NK细胞或组合物或富含g-NK细胞的细胞群体中的方法。在一些实施方案中,将异源药剂包装或并入脂质纳米颗粒中以递送核酸,例如DNA、RNA、mRNA和自扩增RNA(saRNA)。在一些实施方案中,核酸是DNA。在一些实施方案中,核酸是RNA。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,核酸是自扩增RNA(saRNA)。

[0402] 在一些实施方案中,mRNA是自扩增mRNA。自扩增RNA(saRNA)能够通过5'和3'保守序列元件(CSE)和nsP1-4基因以及亚基因组启动子的存在而自我扩增。参见例如Bloom、van den Berg和Arbuthnot, Gene Therapy, 2021年。原位翻译后,nsP1-4蛋白形成RdRP复合物,

其识别片状CSE序列并扩增RNA内含有的序列。saRNA向靶细胞的引入可经由脂质纳米颗粒递送来进行。在一些实施方案中,此类自扩增RNA可具有国际专利申请公开号W0201 1 05799中教导的任一种的结构特征或组分。

[0403] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及使用包括编码异源药剂(如CAR)的mRNA的脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施方案中,编码异源药剂的mRNA可使用本领域已知的方法(诸如体外转录)产生。在该方法的一些实施方案中,mRNA包括5'帽。在一些实施方案中,5'帽为初级转录物诸如信使RNA的5'末端上的改变的核苷酸。在一些方面,mRNA的5'帽改善RNA稳定性和加工、mRNA代谢、细胞核中RNA转录物的加工和成熟、mRNA从细胞核向细胞质的转运、mRNA稳定性和mRNA向蛋白的有效翻译中的一者或多者。在一些实施方案中,5'帽可为天然存在的5'帽或与mRNA的天然存在的帽不同的帽。5'帽可为本领域技术人员已知的任何5'帽。在某些实施方案中,5'帽选自抗反向帽类似物(ARCA)帽、7-甲基-鸟苷(7mG)帽、CleanCap[®]类似物、牛痘帽及其类似物组成的组。例如,5'帽可包括但不限于抗反向帽类似物(ARCA)(US7074596)、7-甲基-鸟苷、CleanCap[®]类似物,诸如Cap 1类似物(Trilink, San Diego, CA),或使用例如牛痘加帽酶等进行酶促加帽。在一些实施方案中,mRNA可以是多腺苷酸化的。mRNA可含有各种5'和3'非翻译序列元件,以增强编码的工程化异源药剂的表达和/或mRNA本身的稳定性。此类元件可包括例如翻译后调节元件,诸如土拨鼠肝炎病毒翻译后调节元件。

[0404] 在一些实施方案中,mRNA包括至少一个核苷修饰。mRNA可含有天然存在的核苷到核苷类似物的修饰。本领域已知的任何核苷类似物都是可以预想的。此类核苷类似物可包括例如在US 8,278,036中描述的那些核苷类似物。在该方法的某些实施方案中,核苷修饰选自自由尿苷到假尿苷和尿苷到N1-甲基假尿苷的修饰组成的组。在该方法的具体实施方案中,核苷修饰为从尿苷到假尿苷的修饰。

[0405] 特别适用于本文方法的LNP包括选自以下各项的阳离子脂质:DLin-DMA(1,2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷)、DLin-MC3-DMA(二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)、DLin-KC2-DMA(2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环)、DODMA(1,2-二油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷)、SS-OP(双[2-(4-{2-[4-(顺-9十八烯基氧基)苯基乙酰氧基]乙基}哌啶基)乙基]二硫化物)及其衍生物。DLin-MC3-DMA及其衍生物描述于例如W02010144740中。DODMA及其衍生物描述于例如US 7,745,651和Mok等人,1999年,Biochimica et Biophysica Acta,第1419卷第2期:第137-150页中。DLin-DMA及其衍生物描述于例如US 7,799,565中。DLin-KC2-DMA及其衍生物描述于例如US 9,139,554中。SS-OP(NOF America Corporation, White Plains, NY)描述于例如www.nofamerica.com/store/index.php?dispatch=products.view&product_id=962。阳离子脂质的附加和非限制性实例包括甲基吡啶基-二烷基酸(MPDACA)、棕榈酰基-油酰基-去甲-精氨酸(PONA)、胍基-二烷基酸(GUADACA)、1,2-二-0-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、双{2-[N-甲基-N-(α -D-生育酚半琥珀酸酯丙基)氨基]乙基}二硫化物(SS-33/3AP05)、双{2-[4-(α -D-生育酚半琥珀酸酯乙基)哌啶基]乙基}二硫化物(SS33/4PE15)、双{2-[4-(顺-9-十八碳烯酸酯乙基)-1-哌啶基]乙基}二硫化物(SS18/4PE16)和双{2-[4-(顺,顺-9,12-十八碳二烯酸酯乙基)-1-哌啶基]乙基}二硫化物(SS18/4PE13)。在其他实施方案中,脂质纳米颗粒还包括一种或多种非阳离子脂质和脂质缀合物。

[0406] 在一些实施方案中,阳离子脂质的摩尔浓度为总脂质摩尔浓度的约20%至约80%、约30%至约70%、约40%至约60%、约45%至约55%或约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%或约80%,其中该总脂质摩尔浓度为阳离子脂质、非阳离子脂质和脂质缀合物摩尔浓度的总和。在某些实施方案中,脂质纳米颗粒的阳离子脂质与mRNA的摩尔比为约1至约20、约2至约16、约4至约12、约6至约10或约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20。

[0407] 在一些实施方案中,本文公开的方法中利用的脂质纳米颗粒可包括至少一种非阳离子脂质。在具体实施方案中,非阳离子脂质的摩尔浓度为总脂质摩尔浓度的约20%至约80%、约30%至约70%、约40%至约70%、约40%至约60%、约46%至约50%或约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约48.5%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%或约80%。在一些实施方案中,非阳离子脂质包括磷脂和类固醇。

[0408] 在一些实施方案中,可用于本文所述的脂质纳米颗粒的磷脂包括但不限于1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DDPC)、1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DEPA-NA)、1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DEPC)、1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DEPE)、1,2-二芥酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠盐)(DEPG-NA)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLOPC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DLPA-NA)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油...)(钠盐)(DLPA-NA)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(铵盐)(DLPG-NH₄)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(钠盐)(DLPS-NA)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DMPA-NA)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠盐)(DMPG-NA)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(铵盐)(DMPG-NH₄)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠/铵盐)(DMPG-NH₄/NA)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(钠盐)(DMPS-NA)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DOPA-NA)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠盐)(DOPG-NA)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(钠盐)(DOPS-NA)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DPPA-NA)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠盐)(DPPG-NA)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(铵盐)(DPPG-NH₄)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(钠盐)(DPPS-NA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸(钠盐)(DSPA-NA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(钠盐)(DSPG-NA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)(铵盐)(DSPG-NH₄)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸丝氨酸(钠盐)(DSPS-NA)、蛋黄PC(EPC)、氢化蛋黄PC(HEPC)、氢化大豆PC(HSPC)、1-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(LY S OPCM YRIS TIC)、1-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(LYSOPCPALMITIC)、1-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(LYSOPC STEARIC)、1-肉豆蔻酰基-

2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(MPPC)、1-肉豆蔻酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(MSPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PMPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(POPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3[磷酸-外消旋-(1-甘油)](钠盐)(POPG-NA)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PS PC)、1-硬脂酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(SMPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(SOPC)和1-硬脂酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(SPPC)。在具体实施方案中,磷脂是DSPC。在具体实施方案中,磷脂是DOPE。在具体实施方案中,磷脂是DOPC。

[0409] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒所包括的非阳离子脂质包括一种或多种类固醇。可用于本文所述的脂质纳米颗粒的类固醇包括但不限于胆甾烷(诸如胆固醇)、胆烷(诸如胆酸)、孕烷(诸如孕酮)、雄甾烷(诸如睾酮)和雌烷(诸如雌二醇)。其他类固醇包括但不限于胆固醇(绵羊)、胆固醇硫酸盐、链甾醇-d6、胆固醇-d7、烯胆甾烷醇-d7、链甾醇、豆甾醇、羊毛甾醇、脱氢胆固醇、二氢羊毛甾醇、酵母甾醇、烯胆甾烷醇、酵母甾醇-d5、14-去甲基-羊毛甾醇、14-去甲基-羊毛甾醇-d6、8(9)-脱氢胆固醇、8(14)-脱氢胆固醇、薯蓣皂苷配基、DHEA硫酸盐、DHEA、羊毛甾醇-d6、二氢羊毛甾醇-d7、菜油甾醇-d6、谷甾醇、羊毛甾醇-95、二氢FF-MAS-d6、酵母烯醇-d7、酵母烯醇、谷甾烷醇、菜油甾烷醇、菜油甾醇、7-去氢去氨甾醇、孕烯醇酮、谷甾醇-d7、二氢T-MAS、 δ 5-燕麦甾醇、芸苔甾醇、二氢FF-MAS、24-亚甲基胆固醇、胆酸衍生物、胆固醇酯和糖基化甾醇。在具体实施方案中,脂质纳米颗粒包括胆固醇。

[0410] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包括脂质缀合物。此类脂缀合物包括但不限于:神经酰胺PEG衍生物,诸如C8 PEG2000神经酰胺、C16 PEG2000神经酰胺、C8PEG5000神经酰胺、C16 PEG5000神经酰胺、C8 PEG750神经酰胺和C16 PEG750神经酰胺,磷酸乙醇胺PEG衍生物,诸如16:0PEG5000PE、14:0PEG5000 PE、18:0PEG5000 PE、18:1PEG5000 PE、16:0PEG3000 PE、14:0PEG3000 PE、18:0PEG3000 PE、18:1PEG3000PE、16:0PEG2000 PE、14:0PEG2000 PE、18:0PEG2000 PE、18:1PEG2000 PE 16:0PEG1000 PE、14:0PEG1000 PE、18:0PEG1000 PE、18:1PEG 1000PE、16:0PEG750 PE、14:0PEG750 PE、18:0PEG750 PE、18:1PEG750 PE、16:0PEG550 PE、14:0PEG550 PE、18:0PEG550 PE、18:1PEG550 PE、16:0PEG350 PE、14:0PEG350 PE、18:0PEG350 PE和18:1PEG350,甾醇PEG衍生物,诸如Chol1-PEG600,以及甘油PEG衍生物,诸如DMG-PEG5000、DSG-PEG5000、DPG-PEG5000、DMG-PEG3000、DSG-PEG3000、DPG-PEG3000、DMG-PEG2000、DSG-PEG2000、DPG-PEG2000、DMG-PEG1000、DSG-PEG1000、DPG-PEG1000、DMG-PEG750、DSG-PEG750、DPG-PEG750、DMG-PEG550、DSG-PEG550、DPG-PEG550、DMG-PEG350、DSG-PEG350和DPG-PEG350。在一些实施方案中,脂质缀合物是DMG-PEG。在一些具体实施方案中,脂质缀合物是DMG-PEG2000。在一些具体实施方案中,脂质缀合物是DMG-PEG5000。

[0411] 本领域技术人员能够选择包括脂质纳米颗粒的阳离子脂质、非阳离子脂质和/或脂质缀合物以及这些脂质彼此之间的相对摩尔比,诸如基于所选择的脂质的特性、向预期靶细胞递送的性质(例如富集g-NK细胞的组合物)和待递送的mRNA的特性。附加考虑因素包括例如烷基链的饱和度以及所选择的脂质的尺寸、电荷、pH、pKa、膜融合性和毒性。因此,可相应地调节每种单独组分的摩尔比。

[0412] 用于该方法的脂质纳米颗粒可通过本领域技术人员已知的各种技术制备。核酸-

脂质颗粒和它们的制备方法公开于例如美国专利公开号20040142025和20070042031中。

[0413] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒将具有约25nm至约500nm范围内的尺寸。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒具有约50nm至约300nm,或约60nm至约120nm的尺寸。脂质纳米颗粒的尺寸可通过准电光散射(QELS)来确定,如Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 第10卷:421A150, 1981年中所述。本领域已知多种方法可用于产生特定尺寸范围的脂质纳米颗粒群体,例如超声处理或均质化。美国专利号4,737,323中描述了一种这样的方法。

[0414] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包括免疫细胞靶向分子,诸如锚定在脂质纳米颗粒的表面上的靶向配体(例如抗体、scFv蛋白、DART分子、肽、适体等),其选择性地将脂质纳米颗粒结合至NK细胞,例如g-NK细胞。

[0415] 在一些实施方案中,可通过电穿孔进行核酸的引入。在一些实施方案中,经由电穿孔将核酸引入g-NK细胞中。在一些实施方案中,核酸是DNA。在一些实施方案中,核酸是RNA。在一些实施方案中, RNA是mRNA。在一些实施方案中, RNA是saRNA。在一些实施方案中,将核酸(诸如mRNA或saRNA)结合到脂质纳米颗粒中,以通过电穿孔递送。

IV. 基因编辑

[0416] 在一些实施方案中,可通过基因编辑对g-NK细胞进行遗传工程化,以改变(例如)降低g-NK细胞对一种或多种基因的表达,从而改变NK细胞的一种或多种性质或活性。例如,用于基因编辑的策略可包括一种或多种策略,这些策略:减少由于g-NK细胞上靶抗原的表达引起的同种相杀(自杀);降低可能导致移植物抗宿主病(GvHD)的不期望的免疫反应性,特别是当输注到免疫受损的HLA匹配受体中时,或者在一些情况下还有当输注到HLA错配受体中时;或者减少宿主因子的免疫抑制,特别是在肿瘤微环境中。在一些实施方案中,与没有进行基因编辑的类似NK细胞相比,工程化g-NK细胞(包括通过一种或多种基因编辑策略工程化的那些)表现出增强的NK细胞响应特性,例如增强的靶标识别、增强的NK细胞响应水平和/或持续时间、改善的NK细胞存活、延迟的NK细胞耗竭和/或增强的靶标识别。

[0417] 在一些实施方案中,通过基因编辑破坏或敲除编码FcR γ 链的基因来生成g-NK细胞。在一些实施方案中,对NK细胞进行遗传工程化以降低或消除人FcR γ 链蛋白的表达或活性。 δ 在一些实施方案中,遗传破坏导致基因中有插入、缺失或突变,诸如开放读码框架内的移码突变和/或过早终止密码子。用于敲除或破坏NK细胞中FcR γ 链的方法描述于PCT公开号W02018/148462和Liu等人, iScience, 2020年, 第23卷: 第101709页中。

[0418] 本领域普通技术人员将理解,存在许多用于破坏FcR γ 链基因的合适方法。例如,整个基因座,诸如FcR γ δ 基因座可缺失。在一些情况下,使基因的一部分(例如外显子或结构域)缺失也是合适的。具体地, FcR γ 的ITAM信号传导结构域可缺失。另选地,所提供的方法还包括将一个或多个氨基酸取代引入基因座,诸如FcR γ 基因座中,诸如失活突变。在一些实施方案中,可将终止密码子引入mRNA, 诸如FcR γ mRNA中,以产生截短和/或失活形式的表达基因, 诸如FcR γ 信号传导衔接子。在一些实施方案中,基因(诸如FcR γ 基因)的调节元件也可突变或缺失,以便降低FcR γ 信号传导衔接子的表达、活性和/或信号传导。

[0419] 在一些实施方案中,可使用位点特异性内切核酸酶在哺乳动物细胞中进行基因破坏。允许基因的位点特异性缺失的内切核酸酶是本领域熟知的,并且可包括TAL核酸酶、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR/Cas(例如Cas9)和Argonaute。产生工程化的位点特异性内切核酸酶的方法是本领域已知的。可对位点特异性内切核酸酶进行工程化以识别特定基

因、使特定基因缺失或修饰特定基因,诸如FcR γ 链基因。

[0420] 在一些实施方案中,通过编辑所提供的g-NK细胞的基因组来对该g-NK细胞进行工程化。在一些实施方案中,基因组的编辑可在从NK细胞的起始样本富集g-NK细胞亚群的方法中进行。因此,应当理解,所提供的方法不需要选择仅编辑已针对FcR γ 链缺陷的NK细胞选择的g-NK细胞的基因组(或仅编辑已通过g-NK替代标记物谱选择或鉴定的g-NK细胞的基因组),而是可涉及对将要或已经优先扩增g-NK细胞或富含g-NK细胞的NK细胞组合物进行基因编辑。因此,富含g-NK细胞的最终细胞组合物包括引入了异源抗原受体(例如CAR)并且已经被基因编辑的g-NK细胞。第VI章节中提供了制备和扩增富含g-NK细胞的组合物的示例性方法。

[0421] 在一些实施方案中,可在扩增g-NK细胞的方法期间的任何合适时间进行基因组的编辑,诸如在第VI章节中所述。在一些实施方案中,在从受试者选择细胞(例如选择或富集CD3^{阴性}CD57^{阳性}或CD3^{阴性}CD56^{阳性}的细胞)之后并且在将所选择或富集的细胞与饲养细胞(例如表达HLA-E的饲养细胞)一起温育或培养以进行NK细胞的增殖或扩增之前进行基因编辑。在一些实施方案中,在与饲养细胞(例如表达HLA-E的饲养细胞)一起温育或培养并且因此在所选择或富集的细胞已经增殖或扩增之后进行基因编辑。在一些实施方案中,基因编辑与用于引入编码异源药剂(如CAR)的多核苷酸的方法以任何顺序依次进行。

[0422] 敲除靶基因表达的方法包括但不限于锌指核酸酶(ZFN)、Tale效应结构域核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas系统。此类方法通常包括向细胞施用编码一种或多种核酸酶的一种或多种多核苷酸,使得核酸酶介导内源性基因的修饰(例如在一种或多种供体序列的存在下),使得供体整合到由核酸酶靶向的内源性基因中。一种或多种供体分子的整合经由同源定向修复(HDR)或通过非同源末端接合(NHEJ)相关修复发生。在某些实施方案中,使用一对或多对核酸酶,这些核酸酶可由相同或不同的核酸编码。

[0423] 在一些实施方案中,使用锌指核酸酶(ZFN)进行基因编辑。ZFN是包括FokI内切核酸酶的非特异性切割结构域(N)和锌指蛋白(ZFP)的融合蛋白。一对ZNF参与识别靶基因中的特定基因座,一个识别待修饰位点的上游序列,另一个识别下游序列,并且ZFN的核酸酶部分在特定基因座处切割,从而导致靶基因的敲除。使用ZFN降低基因表达的方法是人熟知的,例如美国专利号9,045,763以及Durai等人,Zinc Finger Nucleases:Custom-Designed Molecular Scissors for Genome Engineering of Plant and Mammalian cells,Nucleic Acid Research,第33卷第18期:第5978-5990页,2005,年中所公开,这些文献的公开内容通过引用整体并入本文。

[0424] 在一些实施方案中,使用转录激活子样效应核酸酶(TALEN)进行基因编辑。TALEN类似于ZFN,因为它们在基因组位点周围成对结合,并且引导相同的非特异性核酸酶FokI在特定位点处切割基因组,但是每个结构域识别单个核苷酸,而不是识别DNA三联体。使用ZFN来降低基因表达的方法也是为人熟知的,例如美国专利号9,005,973以及Christian等人,Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases,Genetics,第186卷第2期:第757-761页,2010年中所公开,这些文献的公开内容通过引用整体并入本文。

[0425] 在一些实施方案中,使用RNA指导的核酸酶进行基因编辑。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶是RNA指导的DNA内切核酸酶。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶是CRISPR核酸酶。RNA指导的核酸酶的非限制性实例包括PCT公开号WO2020/168300(例如其中的表2)

中所述的任一种核酸酶。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶是Cas9或Cas12核酸酶。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶是Cpf1 (Cas12a)。在一些实施方案中, Cpf1是氨基酸球菌属Cpf1 (AsCpf1)。

[0426] 在一些实施方案中, 只用RNA指导的核酸酶和指导RNA (gRNA) 进行基因编辑。这两种组分形成复合物, 该复合物能够与特定核酸序列缔合并编辑该核酸序列中或周围的DNA, 例如通过进行单链断裂 (SSB或裂口)、双链断裂 (DSB) 和/或点突变中的一者或多者。在一些实施方案中, gRNA包括crRNA和任选的tracrRNA。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶 (例如Cas9或Cas12) 和一种或多种gRNA形成核糖核蛋白 (RNP) 复合物, 该复合物缔合 (即靶向) 并切割与gRNA (例如crRNA) 的靶向 (或间隔子) 序列互补的特定基因座。在一些实施方案中, Cas是Cas9核酸酶, 例如来自酿脓链球菌。应当理解, 本文所用的内切核酸酶不限于通常用于合成Cas9的酿脓链球菌的Cas9 (SpCas9)。在一个方面, Cas9可来自不同的细菌来源。Cas9的取代也可用于增加靶向特异性, 从而需要使用更少的gRNA。因此, 例如, Cas可来源于金黄色葡萄球菌 (SaCas9)、氨基酸球菌属 (AsCpf1)、来源于毛螺旋菌 (*Lachnospiracase bacterium*) 的普雷沃氏菌属和弗朗西斯氏菌属1的成簇规则间隔短回文重复序列 (Cpf1) (LbCpf1)、脑膜炎奈瑟球菌 (NmCas9)、嗜热链球菌 (StCas9)、空肠弯曲杆菌 (CjCas9)、增强型SpCas9 (eSpCas9)、SpCas9-HF1、FokI融合型dCas9或扩展型Cas9 (xCas9)。附加地, 可使用其他Cas内切核酸酶代替Cas9系统, 例如CasX、CasY、Cas14、Cas4、Csn2、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c1或C2c3, 或使用任何其他类型的包括引物编辑的工程化Cas蛋白。

[0427] 在一些实施方案中, 含有RNA指导的核酸酶 (例如Cas) 和gRNA的基因组编辑系统在某些实施方案中被实施为蛋白/RNA复合物 (核糖核蛋白或RNP), 其被引入待编辑细胞内。在一些实施方案中, 将RNP复合物在包封剂 (诸如脂质或聚合物微米颗粒或纳米颗粒、胶束或脂质体) 中引入细胞中。在某些实施方案中, 含有RNA指导的核酸酶 (例如Cas) 和gRNA的基因组编辑系统被实施为编码RNA指导的核酸酶和指导RNA组分的一种或多种核酸。例如, 在某些实施方案中, 基因组编辑系统被实施为包括此类核酸的一种或多种载体, 例如病毒载体, 诸如腺相关病毒。

[0428] 在功能术语中, RNA指导的核酸酶被定义为如下的核酸酶: (a) 与gRNA相互作用 (例如与其复合); 以及 (b) 和gRNA一起, 与DNA的靶区域缔合并任选地切割或修饰该靶区域, 该靶区域包括 (i) 与gRNA的靶向结构域互补的序列和任选的 (ii) 称为“原间隔子相邻基序”或“PAM”的附加序列。PAM序列因其与“原间隔子”序列的顺序关系而得名, 该“原间隔子”序列与gRNA靶向结构域 (或“间隔子”) 互补。PAM序列和原间隔子序列一起限定特定的RNA指导的核酸酶/gRNA组合的靶区域或序列。各种RNA指导的核酸酶可能需要PAM与原间隔子之间的不同顺序关系。例如, Cas9核酸酶识别作为原间隔子的3'的PAM序列, 而另一方面, Cpf1通常识别作为原间隔子的5'的PAM序列。除了识别PAM和原间隔子的特定顺序取向之外, RNA指导的核酸酶还可识别特定的PAM序列。例如, 金黄色葡萄球菌Cas9识别PAM序列NNGRRT或NNGRRV, 其中N残基为gRNA靶向结构域识别的区域的紧邻的3'。酿脓链球菌Cas9识别NGG PAM序列。并且新凶手弗朗西斯菌 (*F. novicida*) Cpf1识别TTN PAM序列。已经鉴定了多种RNA指导的核酸酶的PAM序列, 并且Shmakov等人, 2015年, *Molecular Cell*, 第60卷: 第385-397页, 2015年11月5日描述了一种鉴定新PAM序列的策略。

[0429] 应当理解并且本文设想, 使用特定的Cas可改变Cas内切核酸酶 (或另选的酶) 用于

筛选靶标的PAM序列。如本文所用,合适的PAM序列包括NGG (SpCas9 PAM)、NNGRRT (SaCas9 PAM)、NNNGATT (NmCas9 PAM)、NNNNRYAC (CjCas9 PAM)、NNAGAAW (St)、TTTV (LbCpf1 PAM和AsCpf1 PAM);TYCV (LbCpf1 PAM变体和AsCpf1PAM变体);其中N可为任何核苷酸;V=A、C或G;Y=C或T;W=A或T;并且R=A或G。

[0430] 在一些实施方案中,gRNA促进RNA指导的核酸酶(例如Cas,诸如Cas9或Cpf1)与靶序列(诸如细胞中的基因组序列)的特异性缔合(或“靶向”)。gRNA可以是单分子的(包括单个RNA分子,并且另选地称为嵌合的),或者是模块的(包括多于一个、通常是两个单独的RNA分子,诸如crispr RNA(crRNA)和tracrRNA,它们通常例如通过双链结合而彼此缔合)。指导RNA,无论是单分子的还是模块的,都包括与靶序列内的靶结构域完全或部分互补的“靶向结构域”,该靶序列例如期望编辑的细胞的基因组中的DNA序列。例如,关于Cas9,crRNA是指导RNA,其提供作为与靶DNA互补的核苷酸序列的靶向结构域,并且还可包括用作Cas核酸酶的结合支架的tracr RNA。关于在单一crRNA的指导下诱导双链DNA断裂的Cpf1,不需要tracrRNA,而是crRNA包括参与Cpf1识别的5'柄结构和通过互补结合与靶向DNA序列相互作用的指导片段。靶向结构域长度通常为10-30个核苷酸,并且在某些实施方案中长度为16-24个核苷酸(例如长度为16、17、18、19、20、21、22、23或24个核苷酸)。

[0431] 在一些实施方案中,gRNA(在一些情况下为crRNA)为与靶核酸序列具有足够互补性以与靶核酸序列杂交并且指导核酸靶向复合物与靶核酸序列进行序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,当任选地使用合适的比对算法进行比对时,互补性程度约为或高于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更高。可通过使用用于比对序列的任何合适的算法来确定最佳比对,该算法的非限制性实例包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler转换的算法(例如Burrows Wheeler Aligner)、Clustal 1W、Clustal X、BLAT和本领域技术人员已知的其他算法。指导序列(在核酸靶向指导RNA内)指导核酸靶向复合物与靶核酸序列进行序列特异性结合的能力可通过任何合适的测定法来评估。例如,可将足以形成核酸靶向复合物的核酸靶向CRISPR系统的组分(包括待测试的指导序列)提供给具有对应靶核酸序列的宿主细胞,诸如通过用编码核酸靶向复合物的组分的载体转染,随后评估靶核酸序列内的优先靶向(例如切割)。类似地,靶核酸序列的切割可在试管中通过提供靶核酸序列、核酸靶向复合物的组分(包括待测试的指导序列和不同于测试指导序列的对照指导序列),并在测试指导序列反应和对照指导序列反应之间比较靶序列处的结合或切割速率来评价。

[0432] 用于设计gRNA的方法是本领域技术人员已知的(参见例如Cui等人,2018年,Interdisciplinary Sciences:Computational Life Sciences,第10卷:第455-465页;PCT公开号W02019/010384)。用于选择和验证靶序列的方法以及脱靶分析先前已有描述,例如在Mali、Hsu、Fu等人,2014年,Nat biotechnol,第32卷第3期:第279-84页;Heigwer等人,2014年,Nat methods,第11卷第2期:第122-123页;Bae等人,2014年,Bioinformatics,第30卷第10期:第1473-1475页;和Xiao A等人,2014年,Bioinformatics,第30卷第8期:第1180-1182页中有所描述。作为非限制性实例,gRNA设计可涉及使用软件工具来优化对应于用户靶序列的潜在靶序列的选择,例如,以使整个基因组的总脱靶活性最小化。虽然脱靶活性不限于切割,但在每个脱靶序列处的切割效率可例如使用实验导出的加权方案来预测。

[0433] 例如,包括RNA核苷酸的靶向序列的指导RNA将包括对应于作为DNA序列提供的靶

向结构域序列的RNA序列,并且这含有尿嘧啶而不是胸腺嘧啶核苷酸。例如,包括RNA核苷酸的靶向结构域序列并且由包括胸腺嘧啶分子的DNA序列描述的指导RNA将具有相同的对应RNA序列的靶向结构域,但包括尿嘧啶而不是胸腺嘧啶。对本领域技术人员显而易见的是,此类靶向序列将连接至合适的指导RNA支架,例如crRNA支架序列或嵌合crRNA/tracerRNA支架序列。合适的gRNA支架序列是本领域普通技术人员已知的。例如,对于Cpf1,合适的支架序列包括序列U A AUUU CU ACUCUU GU AG AU (SEQ ID NO:16),该序列添加到靶向结构域的5'末端。

[0434] 在一些实施方案中,增强对抗体(包括MM抗体)的临床ADCC响应的工作一直面临困难,因为NK细胞也表达与肿瘤靶标相同的某些抗原。这些抗原包括例如CD38和SLAMF7。因此,当NK细胞疗法与针对靶抗原的抗体(例如分别用于靶向CD38和SLAMF7的达雷妥尤单抗和埃罗妥珠单抗)组合时,或当NK细胞表达本文针对靶抗原提供的CAR时,该疗法不仅可靶向癌症,而且还可能耗尽患者的NK细胞群体。例如,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。

[0435] 在一些实施方案中,编辑NK细胞以降低靶抗原的表达,该靶抗原已知或怀疑也在一定水平上被NK细胞表达。在一些实施方案中,用靶向靶抗原的gRNA进行基因编辑,该靶抗原已知或怀疑在一定水平上被NK细胞表达。在一些实施方案中,NK细胞表达针对CD38的CAR,并且CD38表达在NK细胞中降低或消除。在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向CD38的gRNA(关于示例性的靶向CD38的gRNA,参见例如W02019/222503、W02021/087466和W02021/113853)。

[0436] 在一些实施方案中,gRNA靶向参与NK细胞的免疫反应性的分子。在一些实施方案中,工程化g-NK细胞表面上的HLA I类表达降低。人白细胞抗原(HLA)系统是一种编码人体中主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的基因复合物。HLA I类蛋白都具有长 α 链和短 β 链B2M。几乎没有HLA I类可在没有B2M的情况下表达,并且B2M的表达是HLA I类蛋白从细胞内部呈递肽所必需的。本公开提供了被工程化以降低B2M表达的g-NK细胞。因此,这些细胞避开了免疫监视,并通过细胞毒性T细胞附着。在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向 β 2微球蛋白(B2M)的gRNA(关于示例性的靶向B2M的gRNA,参见例如W02020/168300、W02018/064694、W02015/161276或W02017/152015)。

[0437] 在一些实施方案中,gRNA靶向参与NK细胞活性的免疫抑制的分子。合适地,工程化NK细胞包括降低的检查点抑制受体功能或没有检查点抑制受体功能。合适地,功能降低或没有功能的检查点抑制受体包括CD96 (TACTILE)、CD 152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT和/或TIM-3中的一者或多者或全部。合适地,NK细胞对于两种或更多种检查点抑制受体包括降低的检查点抑制受体功能或没有检查点抑制受体功能。合适地,该两种或更多种检查点抑制受体包括CD96 (TACTILE)、CD 152 (CTLA4)或CD328 (SIGLEC7)或CD279 (PD-1)。

[0438] 在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向TIGIT的gRNA(关于示例性的靶向TIGIT的gRNA,参见例如W02020/168300)。在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向PD-1的gRNA(关于示例性的靶向PD-1的gRNA,参见例如W02015/161276或W02017/152015)。

[0439] 在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向腺苷受体诸如腺苷A2a受体

(ADORA2a)的gRNA(关于示例性的靶向ADORA2a的gRNA,参见例如W02020/168300)。在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向TGF β 受体诸如TGF β R 2的gRNA(关于示例性的靶向TGF β R 2的gRNA,参见例如W02020/168300)。在一些实施方案中,用于本公开的gRNA为靶向编码细胞因子诱导型含SH2蛋白(CISH)的基因的gRNA(关于示例性的靶向CISH的gRNA,参见例如W02020/168300)。

[0440] 在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶编码和/或gRNA编码DNA可通过例如载体(例如病毒或非病毒载体)、非基于载体的方法(例如使用裸DNA或DNA复合物)或它们的组合递送。在一些实施方案中,编码RNA指导的核酸酶(例如Cas)和/或gRNA的核酸通过AAV递送。用于基因编辑的核酸可作为裸DNA或RNA直接递送至细胞(例如通过转染或电穿孔的方式),或者可与促进靶细胞摄取的分子(例如,N-乙酰半乳糖胺)缀合。

[0441] 在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶和gRNA作为核糖核蛋白(RNP)复合物递送至细胞中。在一些实施方案中,Cas和gRNA被分别纯化,然后组装形成RNP。在一些实施方案中,将一种或多种RNP复合物以任何顺序依次或同时递送至细胞。在一些实施方案中,通过电穿孔将RNP复合物递送至细胞中。在一些实施方案中,使用脂质纳米颗粒将RNP复合物递送至细胞中。

[0442] 在一个非限制性实例中,为了制造RNP复合物,crRNA和tracrRNA可以在约50 μ M与约500 μ M之间(例如,50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、35、375、400、425、450、475或500 μ M)、优选地在100 μ M与约300 μ M之间,最优选地约200 μ M以1:1、2:1或1:2的浓度比在95 $^{\circ}$ C下混合约5分钟,以形成crRNA:tracrRNA复合物(即,指导RNA)。然后crRNA:tracrRNA复合物可与在约20 μ M与约50 μ M之间(例如21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50 μ M)的Cas内切核酸酶(诸如Cas9)的最终稀释液混合。

[0443] 在具体实施方案中,通过电穿孔将RNP复合物引入NK细胞(诸如第VI章节中所述的富集g-NK细胞的扩增的NK细胞)中。电穿孔是一种对细胞施加电场以增加细胞膜通透性的技术。电场的施加引起膜两侧产生电荷梯度,其吸引带电荷的分子(诸如核酸)跨过细胞膜。因此,在一个方面,本文公开了对NK细胞进行遗传修饰的方法,该方法包括:获得对NK细胞中的靶DNA序列具有特异性的指导RNA(gRNA);b)经由电穿孔将核糖核蛋白(RNP)复合物引入靶NK细胞中,该复合物包括与对应CRISPR/Cas指导RNA复合的Cas内切核酸酶(例如Cas9),该CRISPR/Cas指导RNA与NK细胞的基因组DNA内的靶序列杂交。

[0444] 在一些实施方案中,在NK细胞的引入(例如电穿孔)之后,现在经修饰的NK细胞可在包括表达HLA的饲养细胞、通常经辐照的饲养细胞和细胞因子(例如IL-2和IL-21)的培养基中增殖,如在第V章节中所述,诸如在诱导富含g-NK细胞的NK细胞的刺激、增殖或扩增的条件下进行增殖。因此,遗传工程化细胞保留了活力和增殖潜力,因为它们能够在电穿孔后使用经辐照的饲养细胞进行扩增。应当理解并且本文设想,培养期可在引入RNP复合物后的1天与14天之间,诸如电穿孔后(即,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天),诸如在3天与7天之间,例如在4天与6天之间。在一些方面,用于培养工程化NK细胞的培养基还可包括细胞因子,例如IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和/或IL-21,诸如在第V章节中所述。在一些实施方案中,培养基含有IL-2和IL-21。

V. 组合物和药物制剂

[0445] 本文提供了包括工程化g-NK细胞的组合物。在一些实施方案中,组合物的工程化g-NK细胞表达CAR。组合物可包括表达CAR和免疫调节剂二者的多种g-NK细胞。本文提供的组合物(包括药物组合物)可用于任何提供的方法中。本文提供了如本文提供的药物组合物用于与抗体一起的组合法,其供在根据所提供的任一方法治疗受试者的疾病或病症中使用。本文还提供了任何所提供的药物组合物用于制造药物的用途,所述药物供在用于治疗受试者的疾病或病症的组合法中使用。在一些实施方案中,本文还提供了如本文提供的工程化g-NK细胞的药物组合物与单克隆抗体的组合,各自均作为药物供在用于治疗受试者的疾病或病症的组合法中使用。在提供的实施方案中的任何实施方案中,CAR和单克隆抗体都靶向或结合由与疾病或病症相关的细胞表达的抗原。在一些实施方案中,CAR与第一抗原结合,并且单克隆抗体与第二抗原结合。在一些实施方案中,第一和第二抗原相同。在一些实施方案中,所述第一和第二抗原不同。

[0446] 在一些实施方案中,工程化NK细胞包括多种工程化g-NK细胞。在一些实施方案中,大于50%或大于约50%的工程化NK细胞是g-NK细胞。在一些实施方案中,大于60%或大于约60%的工程化NK细胞是g-NK细胞。在一些实施方案中,大于70%或大于约70%的工程化NK细胞是g-NK细胞。在一些实施方案中,大于80%或大于约80%的工程化NK细胞是g-NK细胞。在一些实施方案中,大于90%或大于约90%的工程化NK细胞是g-NK细胞。在一些实施方案中,大于95%或大于约95%的工程化NK细胞是g-NK细胞。

[0447] 在一些实施方案中,组合物包括大于50%或大于约50%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于60%或大于约60%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于70%或大于约70%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于80%或大于约80%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于90%或大于约90%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物包括大于95%或大于约95%的g-NK细胞。

[0448] 在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于50%或大于约50%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于60%或大于约60%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于70%或大于约70%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于80%或大于约80%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于90%或大于约90%的g-NK细胞。在一些实施方案中,组合物的多种NK细胞包括大于95%或大于约95%的g-NK细胞。

[0449] 在一些实施方案中,组合物中大于20%或大于约20%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于30%或大于约30%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于40%或大于约40%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于60%或大于约60%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于70%或大于约70%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于80%或大于约80%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,所述组合物中大于90%或大于约90%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于95%或大于约95%的总细胞包含编码CAR的异源核酸。

[0450] 在一些实施方案中,组合物中大于20%或大于约20%的g-NK细胞包含编码CAR的

胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于95%或大于约95%的g-NK细胞包含编码免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。

[0453] 在一些实施方案中,组合物中大于20%或大于约20%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于30%或大于约30%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于40%或大于约40%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于60%或大于约60%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于70%或大于约70%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于80%或大于约80%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于90%或大于约90%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于95%或大于约95%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。

[0454] 在一些实施方案中,组合物中大于20%或大于约20%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于30%或大于约30%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于40%或大于约40%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于60%或大于约60%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于70%或大于约70%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于80%或大于约80%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于90%或大于约90%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。在一些实施方案中,组合物中大于95%或大于约95%的g-NK细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。

[0455] 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^{阳性}细胞或其亚群。在一些实施方案中,组合物含有NKG2C^{阳性}/NKG2A^{阳性}细胞或其亚群。

[0456] 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。

[0457] 在一些实施方案中,组合物可包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%,或基本上100%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细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的NKG2C^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。

[0458] 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。

[0459] 在一些实施方案中,组合物可包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%,或基本上100%的NKG2A^{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NKG2A^{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NKG2A^{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NKG2A^{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NKG2A^{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NKG2A^{阳性}细胞或其亚群构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的NKG2A^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。

[0460] 在一些实施方案中,组合物包括约5%-99%的NKG2C^{阳性}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NKG2C^{阳性}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NKG2C^{阳性}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NKG2C^{阳性}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。

[0461] 在一些实施方案中,组合物可包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%,或基本上100%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{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}NKG2A^{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}NKG2A^{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}NKG2A^{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}NKG2A^{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}NKG2A^{阳性}细胞或其亚群构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。

[0462] 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。

[0463] 在一些实施方案中,组合物可包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约

70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、或基本上100%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。在另一实施方案中,组合物包括超过70%的g-NK细胞。在另一实施方案中,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细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的g-NK细胞包含如所述的异源核酸。

[0464] 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,其中组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约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,组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%、或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD57^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约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,组合物中至少或至少约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}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD57^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD3^{阳性}CD57^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD57^{阳性}CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。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},任选地在50%与90%之间或在约50%与约90%之间的细胞为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},任选地在70%与90%之间或在约70%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0465] 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

少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的细胞具有CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,组合物中70%至90%或约70%至约90%的细胞具有表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}。在一些实施方案中,组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%、或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约60%的细胞包括表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约70%的细胞包括表型CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}细胞包含如所述的异源核酸。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阴性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/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 ^{阴性},任选地在50%与90%之间或在约50%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阴性}。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 ^{阴性},任选地在70%与90%之间或在约70%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阴性}。

[0466] 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,其中组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、或者至少或至少约95%的细胞具有CD38^{阳性}的表型。在一些实施方案中,组合物中70%至90%或约70%至约90%的细胞具有表型CD38^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%、或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD38^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约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,组合物中至少或至少约70%的细胞包括表型CD38^{阳性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阴性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD38^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD3^{阴性}CD38^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或

大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD38^{阴性}CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。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},任选地在50%与90%之间或在约50%与约90%之间的细胞为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},任选地在70%与90%之间或在约70%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0467] 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,其中组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、或者至少或至少约95%的细胞具有CD16^{阳性}的表型。在一些实施方案中,组合物中70%至90%或约70%至约90%的细胞具有表型CD16^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%、或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD16^{阳性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约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,组合物中至少或至少约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}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD16^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD3^{阳性}CD16^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD16^{阳性}CD45^{阳性}/CD3^{阳性}/CD56^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。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},任选地在50%与90%之间或在约50%与约90%之间的细胞为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},任选地在70%与90%之间或在约70%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阳性}。

[0468] 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,其中组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、或者至少或至少约95%的细胞具有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70%至90%或约70%至约90%的细胞具有表型NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}。在一些实施方案中,组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少

或至少约94%、至少或至少约96%、或者至少或至少约98%的细胞具有表型NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约60%的细胞包括表型NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}。在任何所提供的实施方案中的一些实施方案中,组合物中至少或至少约70%的细胞包括表型NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD3^{阴性}。在一些实施方案中,表型还包括表面表型CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的CD3^{阴性}NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}细胞包含如所述的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}/CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}细胞包含如所述的异源核酸。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 ^{阴性},任选地在50%与90%之间或在约50%与约90%之间的细胞为FcR γ ^{阴性}。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 ^{阴性},任选地在70%与90%之间或在约70%与约90%的细胞为FcR γ ^{阴性}。

[0469] 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50%或大于约50%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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55%或大于约55%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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60%或大于约60%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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65%或大于约65%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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70%或大于约70%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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75%或大于约75%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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80%或大于约80%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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85%或大于约85%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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90%或大于约90%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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95%或大于约95%的NK细胞是g-NK细胞(FcR γ ^{阴性})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CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阴性}。在其他实例中,替代标记物谱可为NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}。在其他实例中,g-NK细胞替代标记物谱为CD38^{阴性}。替代表面标记物谱还可包括表型CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}。

[0470] 在一些实施方案中,组合物的g-NK细胞或其一定百分比(例如大于约70%)对穿孔

素和/或颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物中的自然杀伤细胞富含对穿孔素和颗粒酶B呈阳性的细胞。在一些情况下,自然杀伤细胞对穿孔素和颗粒酶B呈阳性。穿孔素是在NK细胞的颗粒中发现的成孔溶细胞蛋白。脱颗粒后,穿孔素结合至靶细胞的质膜,并以钙依赖性方式寡聚化以在靶细胞上形成孔。颗粒酶B是在自然杀伤细胞和细胞毒性T细胞的颗粒中最常见的丝氨酸蛋白酶。颗粒酶B与穿孔素一起分泌,以介导靶细胞的细胞凋亡。用于测量对穿孔素或颗粒酶B呈阳性的细胞的数量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。在实例中,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。

[0471] 在一些实施方案中,组合物的大于70%或大于约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于70%或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于75%或大于约75%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于75%或大于约75%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于80%或大于约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于80%或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于85%或大于约85%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于85%或大于约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于90%或大于约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于90%或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,组合物的大于95%或大于约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且组合物的大于95%或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的对颗粒酶B和穿孔素呈阳性的细胞包含如所述的异源核酸。

[0472] 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两倍或至少约两倍。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三倍或至少约三倍。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四倍或至少约四倍。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平均水平的至少两倍或至少约两倍。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平均水平的至少三倍或至少约三倍。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平均水平的至少四倍或至少约四倍。

[0473] 在一些实施方案中,组合物中至少或至少约50%的细胞为FcR γ 缺陷型NK细胞(g-NK),其中大于70%或大于约70%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于70%或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于80%或大于约80%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于80%或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于90%或大于约90%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于90%或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于95%或大于约95%的g-NK细胞对穿孔素呈阳性,并且大于95%或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,g-NK细胞为FcR γ ^{阳性}。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的对穿孔素和颗粒酶B呈阳性的细胞包含如所述的异源核酸。

[0474] 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 γ ^{阳性}的细胞表达的穿孔素平均水平的至少两倍或至少约两倍。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 γ ^{阳性}的细胞表达的颗粒酶B平均水平的至少两倍或至少约两倍。

[0475] 在一些实施方案中,组合物中的自然杀伤细胞富含表达或产生CD107A、IFN γ 和TNF- α 的细胞。在一些情况下,此类因子的表达或产生或一定程度的表达或产生是在没有靶抗原的情况下(即,在没有进一步刺激的情况下对于组合物中的细胞是固有的)。在一些情况下,该表达或产生或一定程度的表达或产生是在存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)的情况下。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CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。

[0476] 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15%或大于约15%、大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、或者大于50%或大于约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。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,例如在表达靶抗原的细胞和针对靶抗原的抗体存在或不存在的条件下测量,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的对CD107a呈阳性的细胞包含如所述的异源核酸。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15%或大于约15%、大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、或者大于50%或大于约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CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。

[0477] 在一些实施方案中,组合物中至少或至少约50%的细胞为FcR γ 缺陷型(FcR $\gamma^{\text{缺陷}}$) 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15%或大于约15%的细胞产生效应细胞因子。在一些实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶抗体)的存在下,大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、或者大于50%或大于约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CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。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 。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 。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,例如在表达靶抗原的细胞和针对靶抗原的抗体的存在或不存在下测量,组合物中大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的产生效应细胞因子(例如IFN- γ 或TNF- α)的细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌细胞因子或膜结合细胞因子)的异源核酸。

[0478] 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15%或大于约15%、大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、或者大于50%或大于约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CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。

[0479] 在一些实施方案中,组合物中至少或至少约50%的细胞为FcR γ 缺陷型(FcR $\gamma^{\text{缺陷}}$) 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15%或大于约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20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、或者大于50%或大于约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CD20的肿瘤细胞系,并且抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)。

[0480] 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。

[0481] 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^{阳性}/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}。

[0482] 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。

[0483] 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。

[0484] 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。

[0485] 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10⁶个细胞至为或为约10¹²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10⁶至为或为约10¹¹个细胞、为或为约10⁶至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁹个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁸个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁷个细胞、为或为约10⁷至为或为约10¹²个细胞、为或为约10⁷至为或为约10¹¹个细胞、为或为约10⁷至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁷至为或为约10⁹个细胞、或者为或为约10⁷至为或为约10⁸个细胞、为或为约10⁸至为或为约10¹²个细胞、为或为约10⁸至为或为约10¹¹个细胞、为或为约10⁸至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁸至为或为约10⁹个细胞、为或为约10⁹至为或为约10¹²个细胞、为或为约10⁹至为或为约10¹¹个细胞、为或为约10⁹至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10¹⁰至为或为约10¹²个细胞、为或为约10¹⁰至为或为约10¹¹个细胞、或者为或为约10¹¹至为或为约10¹²个细胞。

[0486] 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10⁶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10⁶至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁹个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁸个细胞、为或为约10⁶至为或为约10⁷个细胞、为或为约10⁷至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁷至为或为约10⁹个细胞、为或为约10⁷至为或为约10⁸个细胞、为或为约10⁸至为或为约10¹⁰个细胞、为或为约10⁸至为或为约10⁹个细胞、或者为或为约10⁹至为或为约10¹⁰个细胞。

[0487] 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10⁸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10⁹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10¹⁰个细胞。

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。

[0488] 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 ^{阴性}。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/阴性}/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}。

[0489] 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。在具体实施方案中,扩增导致某些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)的数量增加为或为约1,000倍。在具体实施方案中,扩增导致某些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)的数量增加为或为约3,000倍。在

具体实施方案中,扩增导致某些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)的数量增加为或为约35,000倍。

[0490] 在一些情况下,通过所提供的方法从获自单个供体的NK细胞初始来源实现的扩增可产生细胞组合物,从而提供用于向有需要的受试者施用的多个单独剂量。因此,所提供的方法特别适用于异体方法。在一些情况下,根据所提供的方法从分离自一个供体的NK细胞的起始群体进行的单次扩增可产生用于向有需要的受试者施用的大于为或大于为约20个单独剂量,诸如以为或为约以下单独剂量:30个单独剂量、40个单独剂量、50个单独剂量、60个单独剂量、70个单独剂量、80个单独剂量、90个单独剂量、100个单独剂量或为前述值中的任何值之间的值的单独剂量。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 1×10^7 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 1×10^5 个细胞/kg至为或为约 5×10^6 个细胞/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 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 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,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。

[0491] 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。

[0492] 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, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA)。此类载体或稀释剂的实例包括但不限于水、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。

[0493] 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, Mikes 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)。

[0494] 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。

[0495] 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。

[0496] 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。

[0497] 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。

[0498] 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。

[0499] 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。

[0500] 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。

[0501] 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。

[0502] 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°C 的超低温室内冷冻过夜。

[0503] 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、洗涤并重悬浮于药理学上可接受的缓冲液中。

VI. 用于扩增自然杀伤细胞亚群的方法

[0504] 在一些实施方案中,工程化g-NK细胞是从受试者的原代细胞扩增而来,并经基因工程化处理以表达CAR以及在一些情况下表达一种或多种其他异源药剂。在一些实施方案中,产生包含基因工程化g-NK细胞群体或多个基因工程化g-NK细胞的组合物的方法包括将

编码CAR的核酸引入g-NK细胞或富含或扩增g-NK细胞的组合物或细胞群体中,以及(b)引入g-NK细胞中。在一些实施方案中,所述方法包括:(a)将编码CAR的核酸引入g-NK细胞,或富含或扩增g-NK细胞的组合物或细胞群体,和(b)将编码免疫调节剂(如细胞因子,如可分泌或可溶性细胞因子或膜结合的细胞因子)的核酸引入g-NK细胞,或富含或扩增g-NK细胞的组合物或细胞群体,其中步骤(a)和(b)以任何顺序同时或依次进行。

[0505] 在一些实施方案中,还可进行一个或多个基因编辑步骤,以产生这样的细胞,其中已经在工程化细胞的基因组中编辑(诸如敲除)了一个或多个基因。在一些实施方案中,用于基因编辑的方法(诸如通过将RNA指导的核酸酶(例如RNP复合物)引入g-NK细胞中或富含g-NK细胞或扩增g-NK细胞的细胞组合物或群体中)可与引入异源核酸的步骤同时进行或以任何顺序依序进行。

[0506] 在一些实施方案中,对细胞进行工程化的步骤可与用于从来自受试者的生物样本富集和扩增g-NK细胞的方法结合进行。用于富集或扩增g-NK细胞的方法可包括PCT公开号W02020/107002或PCT专利申请号PCT/US2021/028504中所述的方法。用于富集g-NK细胞和优先扩增此类细胞的示例性方法在下文进一步详细所述。

[0507] 在一些方面,可将异源核酸引入g-NK细胞中,以用于稳定整合到基因组中或用于瞬时表达。当将核酸引入g-NK细胞中以用于稳定整合时,可在培养工程化NK细胞群体之前将其引入,使得核酸被稳定整合并且将在工程化NK细胞后代中增殖。在一些实施方案中,经由病毒载体将核酸引入g-NK细胞中。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。

[0508] 在一些实施方案中,在将富集的g-NK细胞在进一步扩增的条件下培养或温育之前,进行对细胞工程化的步骤,诸如以用于将异源药剂稳定整合到NK细胞的基因组中。在一些实施方案中,NK细胞如以下第VI.A章节中所述从生物样本分离,然后引入异源核酸,然后使用第VI.B章节中所述的方法扩增细胞。在一些实施方案中,通过基因编辑方法与引入异源核酸同时或顺序地进一步对细胞进行工程化。在一些实施方案中,在进行第VI.B章节中所述的扩增方法之前,通过基因编辑对细胞进行工程化。

[0509] 在一些实施方案中,在将富集的g-NK细胞在进一步扩增的条件下培养或温育期间,进行对细胞工程化的步骤,诸如以用于将异源药剂稳定整合到NK细胞的基因组中。例如,NK细胞如以下第VI.A章节中所述从生物样本分离,然后根据第VI.B章节中所述的方法进行第一次扩增期。第一次扩增期是第VI.B章节中所述的总扩增期的一部分,其中扩增期的剩余部分通过进行第二次扩增期来实现。例如,第一次扩增期为以下时间或约以下时间:1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些实施方案中,在第一次扩增期之后,收集细胞,然后引入异源核酸,然后使用第VI.B章节中所述的方法在第二次扩增期进一步扩增细胞。第二次扩增期是第VI.B章节中所述的总扩增期的一部分,诸如直至扩增了阈值数量的富含g-NK细胞的细胞。例如,第二次扩增期为以下时间或约以下时间:1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些实施方案中,通过基因编辑方法与引入异源核酸同时或顺序地进一步对细胞进行工程化。在一些实施方案中,在如第VI.A章节中所述从生物样本分离或选择细胞以富集g-NK细胞之后,并且在进行第一次扩增之前,通过基因编辑来对细胞进行工程化。

[0510] 在其他方面,可将异源核酸(诸如编码CAR以及另外地,在一些情况下编码免疫调节剂的核酸)引入g-NK细胞中,以用于瞬时表达。在其他方面,可将编码免疫调节剂的核酸引

入g-NK细胞中,以用于瞬时表达。当将核酸引入g-NK细胞中以用于瞬时表达时,可在培养工程化NK细胞群体之后将其引入,因为瞬时表达的核酸可能不能持久存在足够长的时间或不能充分增殖到所培养的群体的所有细胞中。在一些实施方案中,异源的核酸在工程化NK细胞中瞬时表达。在一些实施方案中,经由纳米颗粒递送引入核酸。在一些实施方案中,经由电穿孔引入核酸。

[0511] 因此,在扩增g-NK细胞的一些方法中,应当在将异源核酸引入扩增群体的NK细胞中之前,在扩增条件下培养富集的NK细胞群体。这特别适用于异源药剂(例如CAR或免疫调节剂)经工程化以被瞬时表达(例如,经由mRNA)的情况。

[0512] 扩增富含g-NK细胞的NK细胞的示例性方法描述于以下第VI.A章节和第VI.B章节中。在一些实施方案中,扩增g-NK细胞的方法包括:(a)获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中富集NK细胞的群体选自来自人受试者的生物样本;(b)在具有以下物质的培养基中培养富集的NK细胞群体:(i)经辐照的HLA-E+饲养细胞,其中该饲养细胞在HLA I类和HLA II类方面存在缺陷,并且其中经辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比例为1:10至10:1;和(ii)用于扩增NK细胞的有效量的两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-2,并且至少一种重组细胞因子是IL-21,从而产生NK细胞扩增群体;(c)将编码异源药剂(诸如CAR)的核酸引入NK细胞扩增群体的NK细胞中,其中该方法产生工程化NK细胞扩增群体,该群体富含工程化g-NK细胞,例如用CAR工程化的g-NK细胞。。

[0513] 在一些实施方案中,在将富集的g-NK细胞在进一步扩增的条件下培养或温育之后,进行对细胞工程化的步骤,诸如以用于将异源药剂瞬时表达达到NK细胞的基因组中。在一些实施方案中,NK细胞如以下第VI.A章节中所述从生物样本分离,使用第VI.B章节中所述的方法扩增,然后引入异源核酸(诸如编码CAR的异源核酸)。在一些实施方案中,通过基因编辑方法与引入异源核酸(诸如编码CAR的核酸)同时或顺序地进一步对细胞进行工程化。在一些实施方案中,在进行第VI.B章节中所述的扩增方法之前,通过基因编辑对细胞进行工程化。

A. 从生物样品中选择细胞用于富集g-NK细胞的方法

[0514] 在一些实施方案中,g-NK细胞组合物(包括含有工程化g-NK细胞的组合物)通过以下方法产生,这些方法包括用于通过从来自人受试者的生物样本的NK细胞的亚群进行g-NK细胞的体外扩增来富集g-NK细胞的方法。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从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,该方法可包括从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,该方法可包括从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,该方法包括从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。

[0515] 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作用于富集或选择用于扩增的NK细胞亚群的细胞。

[0516] 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。

[0517] 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。

[0518] 在一些实例中,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。

[0519] 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血细胞单采血液成分产物。在一些实施方案中,富集的血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,富集的血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。

[0520] 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 。

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。

[0523] 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。

[0524] 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。

[0525] 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。

[0526] 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。

[0527] 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^{阴性}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。

[0528] 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,CD16F158V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。

[0529] 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(Chomoczynski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)。

[0530] 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。

[0531] 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:17)和5'-GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA-3' (SEQ ID NO:18),而第二PCR引物是5'-ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT-3' (SEQ ID NO:19)和5'-ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC-3' (SEQ ID NO:20),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:21 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:22 (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:21 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:23 (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:21 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT)和SEQ ID NO:24 (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:25 (5'-CCAAAAGCCACACTCAAAGAC-3')中所示的CD16正义和SEQ ID NO:26 (5'-ACCCAGGTGGAAGAATGATG-3')中所示的反义以及SEQ ID NO:27 (5'-AACATCACCATCACTCAAGGTTTGG-3')中所示的TaqMan探针。

[0532] 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:28, 5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAA-3'中所示的正向引物;和SEQ ID NO:29, 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:30, 5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAC-3'中所示的正向引物;和SEQ ID NO:29, 5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3'中所示的反向引物)一起使用。

[0533] 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:31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MWQLLLPTALLLLVSA (SEQ ID NO:32)所示的信号肽。

```
GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQAS  
SYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRVWFKEEDPIHLRC  
HSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSS
```

ETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDP
QDK (SEQ ID NO:31)

[0534] CD16 158V+的序列(导致F158V的多态性)被称为VAR_003960并且具有SEQ ID NO:33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:32)所示的信号肽。

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQAS
SYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRC
HSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSS
ETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDP
QDK (SEQ ID NO:33)

[0535] 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)。

[0536] 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。

[0537] 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。

[0538] 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较低水平(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较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较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)上不存在或以相对较低水平表达的那些标记物。

[0539] 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)。

[0540] 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。在一些实例中,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群体中的小百分比的呈CD3^{阳性}的细胞。在一些实例中,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群体中的CD57或CD16群体中的另一者。

[0541] 在一些实例中,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。在一些实例中,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。

[0542] 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^{阴性})。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^{阴性})。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^{阴性})、表达CD161的细胞的阴性选择(CD161^{阴性})、表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{阴性})、和/或表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{阴性})。在一些实施方案中,选择包括分离对CD3呈阴性的细胞(CD3^{阴性})。

[0543] 在一些实施方案中,分离包括表达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^{阴性}CD56^{阳性}CD38^{阴性}。

[0544] 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^{阴性})、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^{阴性})和对表达CD161的细胞的阴性选择(CD161^{阴性})。在具体实施方案中,分离的或选择的细胞是CD3^{阴性}CD56^{阳性}NKG2A^{阴性}CD161^{阴性}。

[0545] 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^{阴性}CD57^{阳性}。

[0546] 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^{阴性}CD16^{阳性}。

[0547] 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^{阴性}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MACSTM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^{阴性}/CD57^{阳性}的NK细胞然后可在所提供方法中用于扩增。

[0548] 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^{阴性}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^{阴性}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^{阴性}CD57^{阳性}NKG2C^{阳性}

NKG2A^{阴性}。

[0549] 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^{阳性}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^{阳性}NKG2A^{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^{阳性}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}。

[0550] 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^{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})、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^{阳性}。

[0551] 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^{阳性}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^{阳性}NKG2A^{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}NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}。

[0552] 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^{阳性}/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}。

[0553] 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。

[0554] 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)。

[0555] 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。

[0556] 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接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0557] 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。

[0558] 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。

B. 扩增富集g-NK细胞的NK细胞的方法

[0559] 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。

[0560] 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,这种杂合的实例是含有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实例是221-AEH细胞。

[0561] 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。

[0562] 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,ARad-Sure™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。

[0563] 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。

[0564] 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。

[0565] 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。

[0566] 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。

[0567] 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。

[0568] 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。

[0569] 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。

[0570] 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。

[0571] 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)。

[0572] 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。

[0573] 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。

[0574] 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。

[0575] “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。抗体片段的实例包括但不限于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(。

[0576] 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。

[0577] 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VI.A小节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。

[0578] 在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体,诸如如VI.A小节所述的选自或分离的,包含至少为或为约 2.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 3.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 4.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 5.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 6.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 7.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 8.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 9.0×10^6 个富集NK细胞、至少为或为约 1.0×10^7 个富集NK细胞、至少为或为约 5.0×10^7 个富集NK细胞、至少为或为约 1.0×10^8 个富集NK细胞、至少为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、或者至少为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,富集的NK细胞群体包含至少为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,富集的NK细胞群体包含至少为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞。在一些实施方案

中,富集的NK细胞群体包含至少为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞。

[0579] 在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体,诸如如VI.A小节所述的选自或分离的,包含为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞、为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞、为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞、或者为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体包括为或为约 2.0×10^5 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^7 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体包括为或为约 1.0×10^6 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^8 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体包括为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 5.0×10^8 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,在开始孵育或培养时,富集的NK细胞群体包括为或为约 1.0×10^7 个富集的NK细胞至为或为约 1.0×10^9 个富集的NK细胞。

[0580] 在一些实施方案中,在开始孵育或培养时存在的富集的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,在开始孵育或培养时的富集的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,在开始孵育或培养时的富集的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,在开始孵育或培养时的富集的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%。

[0581] 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。

[0582] 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。

[0583] 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。

[0584] 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至或为约500IU/mL之间,诸如为或为约1IU/mL至或为约250IU/mL之间、为或为约1IU/mL至或为约100IU/mL之间、为或为约1IU/mL至或为约50IU/mL之间、为或为约50IU/mL至或为约500IU/mL之间、为或为约50IU/mL至或为约250IU/mL之间、为或为约50IU/mL至或为约100IU/mL之间、为或为约100IU/mL至或为约500IU/mL之间、为或为约100IU/mL至或为约250IU/mL之间、或者为或为约250IU/mL至或为约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。

[0585] 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的浓度为或为约25ng/mL。

[0586] 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。

[0587] 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。

[0588] 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。

[0589] 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。

[0590] 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。

[0591] 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。

[0592] 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。

[0593] 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。

[0594] 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。

[0595] 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。

[0596] 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。

[0597] 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。

[0598] 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-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、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。

[0599] 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。

[0600] 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。

[0601] 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。

[0602] 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。

[0603] 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-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。

[0604] 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实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)。

[0605] 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 V[™]无血清培养基、MARROWMAX[™]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。

[0606] 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ 下在5%CO₂中进行。

[0607] 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。

[0608] 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°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。

[0609] 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。

[0610] 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,使用整合或内含系统中的系统、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。

[0611] 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。

[0612] 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。

[0613] 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。

[0614] 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。

[0615] 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洗涤冷冻保存的组合物。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。一个实例涉及使用含有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

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(CryoStorTMCS10或CS5)。CryoStorTMCS10是含有10%二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基。CryoStorTMCS5是含有5%二甲基亚砜(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)。

[0616] 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 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。

[0617] 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。

[0618] 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^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 6.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 7.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 8.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 9.0×10^8 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 3.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 4.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 5.0×10^9 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 1.5×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞、至少为或约 2.0×10^{10} 个NKG2C^{阳性}NKG2A^{阳性}细胞或更多的时间。

阳性⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 4.0×10^9 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 5.0×10^9 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 1.0×10^{10} 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 1.5×10^{10} 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 2.0×10^{10} 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞、至少为或约 2.5×10^{10} 个 NKG2C⁺ NKG2A⁺ 细胞或更多的时间。

[0619] 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。

[0620] 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。

[0621] 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。

[0622] 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具体标记物(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。

[0623] 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。

[0624] 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。

[0625] 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。

[0626] 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。

[0627] 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:34再现。

MIPAVLLLLLLLVEQAAAALGEPQLCYILILFLYGIVLT

LLYCRLKIQVRKAAITSYEK SDGVYTGLTRNQETETLKHEKPPQ (SEQ ID NO:34)

[0628] 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 ^{阴性}的细胞。

[0629] 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 ^{阴性}。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 ^{阴性}。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 ^{阴性}。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。

[0630] 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。

[0631] 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/阳性})、CD161 (CD161^{阳性})和/或NKG2A (NKG2A^{阳性})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^{阳性}/CD56^{阳性}/CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阳性}/CD161^{阳性}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^{阳性}/CD56^{阳性}/NKG2A^{阳性}/CD161^{阳性}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^{阳性}的g-NK细胞。

[0632] 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。

[0633] 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。

[0634] 在任何此类实施方案中的一些实施方案中,扩增群体中大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大

于95%或大于约95%的总细胞包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌或膜结合的细胞因子)的异源核酸。在任何此类实施方案中的一些实施方案中,扩增群体中大于20%或大于约20%、大于30%或大于约30%、大于40%或大于约40%、大于50%或大于约50%、大于60%或大于约60%、大于70%或大于约70%、大于80%或大于约80%、大于90%或大于约90%、或者大于95%或大于约95%的g-NK细胞或具有如本文所述的g-NK细胞的替代标记物谱的细胞亚群包含编码CAR和免疫调节剂(例如细胞因子,所述的可分泌或膜结合的细胞因子)的异源核酸。

[0635] 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。

[0636] 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。

[0637] 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。

[0638] 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。

[0639] 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的一次或多次洗涤。

[0640] 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。

[0641] 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。

[0642] 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/阴性}/CD161^{阴性}的细胞。

[0643] 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^{阴性}/CD161^{阴性}的细胞。

[0644] 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。在此类方法的实例中,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。

VII. 试剂盒和制品

[0645] 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,g-NK细胞是如本文所述的工程化g-NK细胞。在一些实施方案中,通过任何所提供的方法产生组合物。在一些实施方案中,试剂盒还包括单克隆抗体,如所述的任何单克隆抗体。在一些实施方案中,试剂盒包含所提供组合物和将该工程化细胞的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的组合物和用于施用工程化细胞和单克隆抗体的组合的说明书中的任一者的试剂盒。示例性包括如本文所述的任何药剂的其他附加药剂包括在试剂盒中。

[0646] 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。

[0647] 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在同一容器中的细胞、抗体或试剂。

[0648] 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。

[0649] 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。

VIII. 示例性实施方案

[0650] 本文所提供的实施方案为:

1. 一种诱导溶细胞杀伤靶细胞的方法,所述方法包括使已知或疑似表达第一抗原和第二抗原的靶细胞与以下接触:

(a) 包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含与所述第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及

(b) 与所述第二抗原结合的单克隆抗体。

2. 实施方案1的方法,其中所述第一抗原和第二抗原是不同的。

3. 实施方案1的方法,其中第一和第二抗原是相同的。

4. 实施方案1-3中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是全长抗体。

5. 实施方案1-4中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

6. 实施方案1-5中任一项的方法,其中所述CAR和单克隆抗体结合至相同抗原的不同表位。

7. 实施方案1-6中任一项的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

8. 实施方案1-7中任一项的方法,其中所述肿瘤细胞是血液系统恶性肿瘤细胞。

9. 实施方案8的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自由CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD123、SLAMF7、GPRC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。

10. 实施方案8-9中任一项的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是多发性骨髓瘤。

11. 实施方案1-10中任一个的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自由CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPRC5D和BCMA组成的组。

12. 实施方案1-11中任一个的方法,其中所述CAR是抗BCMACAR,且所述单克隆抗体是抗CD38抗体。

13. 实施方案12的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗。

14. 实施方案8或实施方案9的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是淋巴瘤。

15. 实施方案14所述的方法,其中所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

16. 实施方案1-9、14和15中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原选自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。

17. 实施方案1-9和14-16中任一项的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且所述抗体是抗CD20抗体。

18. 实施方案17的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗、奥妥珠单抗和奥法木单抗。

19. 实施方案8或实施方案9的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤细胞是淋巴瘤。

20. 实施方案19的方法,其中所述白血病是急性髓系白血病(AML)。

21. 实施方案1-9、19和20中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原选自由CD123、F1t3、CD70、CD33、CLEC12A、CD38组成的组。

22. 实施方案1-7中任一项的方法,其中所述肿瘤细胞是血液系统恶性肿瘤细胞。

23. 实施方案1-7和22中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原选自由GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUCI16eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 组成的组。

24. 实施方案1-23中任一项的方法,其中所述单克隆抗体与来自包含所述g-NK细胞的组合物的细胞分开接触。

25. 实施方案1-24中任一项的方法,其中与包含g-NK细胞的所述组合物的接触以及与所述单克隆抗体的接触的至少一部分是同时进行的。

26. 实施方案1-25中任一项的方法,其中与包含g-NK细胞的所述组合物的接触以及与所述单克隆抗体的接触是同时进行的。

27. 实施方案1-23中任一项的方法,其中所述单克隆抗体可分泌自所述g-NK细胞。

28. 实施方案1-27中任一项的方法,其中所述接触在受试者体内进行。

29. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括:

(a) 向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述NK细胞疗法包含一定剂量的包含缺乏FcR γ 链的表达的自然杀伤(NK)细胞(g-NK细胞)的组合物,其中所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含与第一抗原结合的细胞外结合结构域,所述第一抗原由所

述癌症的细胞表达;以及

(b) 向所述受试者施用一定剂量的单克隆抗体,所述单克隆抗体与第二抗原结合,所述第二抗原由所述癌症的细胞表达。

30. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用NK细胞疗法,所述NK细胞疗法包含一定剂量的组合物,所述组合物包含缺乏FcR γ 链的自然的杀伤(NK)细胞(g-NK细胞),其中:

所述g-NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域与第一抗原结合,所述第一抗原由所述癌症的细胞表达;以及

所述g-NK细胞表达可分泌的单克隆抗体,所述抗体与第二抗原结合,所述第二抗原由所述癌症的细胞表达。

31. 实施方案29或实施方案30的方法,其中所述第一和第二抗原是不同的。

32. 实施方案29或实施方案30的方法,其中所述第一和第二抗原是相同的。

33. 实施方案29-32中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是全长抗体。

34. 实施方案29-33中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

35. 实施方案29-34中任一项的方法,其中所述CAR和单克隆抗体结合至相同抗原的不同表位。

36. 实施方案29-34中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原由所述癌症的相同细胞表达。

37. 实施方案29-36中任一项的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。

38. 实施方案29-37的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自由CD30、CD19、CD20、CD22、ROR1、Igk、CD38、CD138、BCMA、CD33、CD70、CD123、SLAMF7、GPRC5D、FCRH5、FLT3、CLEC12和Lewis Y抗原组成的组。

39. 实施方案29-38中任一项的方法,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。

40. 实施方案39的方法,其中所述多发性骨髓瘤是复发/难治性多发性骨髓瘤。

41. 实施方案29-40中任一项的方法,其中所述第一抗原和第二抗原选自由CD38、SLAMF7、CD138、FCRH5、GPRC5D和BCMA组成的组。

42. 实施方案29-41中任一个的方法,其中所述CAR是抗BCMACAR,且所述单克隆抗体是抗CD38抗体。

43. 实施方案42的方法,其中所述抗CD38抗体是达雷妥尤单抗或伊莎妥昔单抗。

44. 实施方案29-38中任一项的方法,其中所述癌症是淋巴瘤。

45. 实施方案44的方法,其中所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

46. 实施方案45所述的方法,其中所述NHL是复发/难治性多发性NHL。

47. 实施方案29-38和44-46中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原选自由CD19、CD20、CD22、ROR1和CD30组成的组。

48. 实施方案29-38和44-47中任一项的方法,其中所述CAR是抗CD19 CAR,并且所述抗体是抗CD20抗体。

49. 实施方案48所述的方法,其中所述抗CD20抗体是利妥昔单抗、奥妥珠单抗和奥法木单抗。

50. 实施方案29-38中任一项的方法,其中所述癌症是白血病。

51. 实施方案50的方法,其中所述白血病是急性髓系白血病(AML)。

52. 实施方案21的方法,其中所述AML是复发/难治性AML。

53. 实施方案29-38和49-52中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原选自CD123、Flt3、CD70、CD33、CLEC12A、CD38组成的组。

54. 实施方案29-38中任一项的方法,其中所述癌症是实体癌。

55. 实施方案29-38和54中任一项的方法,其中所述第一和第二抗原是GPC3、HER2、GD2、EGFR突变体III(EGFR vIII)、EGFR、CEA、PSMA、FR α 、FAP、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、EPCAM、MUC1、ROR1、MUC116eto、VEGFR2、CD171、PSCA、EphA2、生存素、间皮素、TROP2、B7H3、CCR4、PDGFR α 、粘连蛋白4、组织因子、CLDN6、FGFR2b和IL-13 α 。

56. 实施方案29-55中任一项的方法,其中所述一定剂量的g-NK细胞的组合物包含多个数量的剂量。

57. 实施方案29-56中任一项的方法,其中所述NK细胞疗法包括施用1-8个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物。

58. 实施方案29-57中任一项的方法,其中每个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物每周施用一次。

59. 实施方案29-58中任一项的方法,其中所述NK细胞疗法在14天周期内以两个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物施用,其中所述14天周期重复一至三次。

60. 实施方案29-58中任一项的方法,其中所述NK细胞疗法在21天周期内施用以两个剂量的所述包含g-NK细胞的组合物施用,其中所述21天周期重复一至三次。

61. 实施方案29-60中任一项的方法,其中:

在施用所述一定剂量的g-NK细胞之前,所述受试者已接受淋巴清除疗法;或者所述方法还包括在施用所述g-NK细胞之前向所述受试者施用淋巴清除疗法。

62. 实施方案61的方法,其中所述一定剂量的g-NK细胞的施用在所述淋巴清除疗法开始后两周内或两周时或约两周开始。

63. 实施方案61或权利要求62的方法,其中一定剂量的g-NK细胞的施用在所述淋巴清除疗法开始后7天内或7天时或约7天时开始。

64. 实施方案59或权利要求60的方法,其中在重复随后的周期之前,向所述受试者施用淋巴清除疗法。

65. 实施方案61-64中任一项的方法,其中所述淋巴清除疗法包含氟达拉滨和/或环磷酰胺。

66. 实施方案61-64中任一项的方法,其中所述淋巴清除疗法包含氟达拉滨和环磷酰胺。

67. 实施方案61-66中任一项的方法,其中所述淋巴清除包括施用为或约20-40mg/m²受试者体表面积 of 氟达拉滨,任选地为或约30mg/m²,每天一次,持续2-4天;和/或为或约200-400mg/m²受试者体表面积的环磷酰胺,任选地为或约300mg/m²,每天一次,持续2-4天。

68. 实施方案61-67中任一项的方法,其中所述淋巴清除疗法包括施用为或约30mg/m²受试者体表面积的氟达拉滨,每天一次,以及为或约300mg/m²受试者体表面积的环磷酰胺,每天一次,各持续2-4天,任选地3天。

69. 实施方案29和31-68中任一项的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的

施用是在所述NK细胞疗法的施用前一个月内开始的。

70. 实施方案29和31-69中任一项手速的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的施用是在所述NK细胞疗法的施用前三周内开始的。

71. 实施方案29和31-70中任一项的方法,其中至少一个剂量的所述单克隆抗体的施用是在所述NK细胞疗法的施用之前两周内开始的。

72. 实施方案29和31-71中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是通过静脉施用的。

73. 实施方案29和31-71中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是通过皮下施用的。

74. 实施方案73的方法,其中负荷剂量的所述单克隆抗体是在皮下施用之前静脉内施用的。

75. 实施方案29和31-74中任一项的方法,其中所述一定剂量的单克隆抗体包含多个数量的剂量。

76. 实施方案29和31-75中任一项的方法,其中所述单克隆抗体是按每四周一次、每三周一次、每两周一次、每周一次或每周两次施用的。

77. 实施方案29和31-76中任一项的方法,其中每个剂量的所述单克隆抗体每周施用一次。

78. 实施方案29和31-77中任一项的方法,其中所述单克隆抗体以4至16个剂量施用,任选地为或约4个剂量或为或约8个剂量。

79. 实施方案1-78中任一项的用途,其中所述CAR包含1) 与所述第一抗原结合的抗原结合结构域;2) 间隔子;3) 跨膜区;以及4) 细胞内信号传导结构域。

80. 实施方案79的方法,其中所述抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。

81. 实施方案79或实施方案80的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40中的一个或多个信号传导结构域。

82. 实施方案79或实施方案80的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、DAP10、DAP12、CD28、4-1BB或OX40中的两个或更多个信号传导结构域。

83. 实施方案79-82中任一项的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含含有CD3 ζ 的信号传导结构域的初级信号传导结构域。

84. 实施方案83的方法,其中所述细胞内信号传导结构域还包含共刺激信号传导结构域,任选地其中所述共刺激信号传导结构域是CD28或4-1BB的信号传导结构域。

85. 实施方案1-84中任一项的方法,其中编码所述CAR的异源核酸被稳定地整合至所述细胞的基因组中。

86. 实施方案1-84中任一项的方法,其中编码所述CAR的异源核酸是瞬时表达的。

87. 实施方案1-86中任一项的方法,其中所述g-NK细胞还包含编码免疫调节蛋白的异源核酸。

88. 实施方案87的方法,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子。

89. 实施方案88的方法,其中所述细胞因子可分泌自所述g-NK细胞。

90. 实施方案89的方法,其中所述可分泌的细胞因子是IL-2或其生物部分;IL-15或其生物部分;或IL-21或其生物部分;或其组合。

91. 实施方案88的方法,其中所述细胞因子是膜结合的。

92. 实施方案91的方法,其中所述膜结合的细胞因子是膜结合的IL-2(mbIL-2);膜结合的IL-15(mbIL-15);膜结合的IL-21(mbIL-21);或其组合。

93. 实施方案87-92中任一项的方法,其中编码所述免疫调节剂的异源核酸被稳定地整合至所述细胞的基因组中。

94. 实施方案93中任一项的方法,其中编码所述免疫调节剂的异源核酸是瞬时表达的。

95. 实施方案1-94中任一项的方法,其还包括施用外源性细胞因子以促进所述g-NK细胞在所述受试者体内的扩增或持续存在,任选地其中所述外源性细胞因子是或包含IL-15。

96. 实施方案1-95中任一项的方法,其中所述g-NK细胞中的FcR γ 链是不可通过免疫印迹检测到的。

97. 实施方案1-96中任一项所述的方法,其中在所述g-NK细胞组合物的细胞中,大于为或约60%的细胞是g-NK细胞,大于为或约70%的细胞是g-NK细胞,大于为或约80%的细胞是g-NK细胞,大于为或约90%的细胞是g-NK细胞,或大于为或约95%的细胞是g-NK细胞。

98. 实施方案1-97中任一项的方法,其中所述g-NK细胞组合物中至少为或约50%的细胞是FcR γ 缺乏的(FcR $\gamma^{\text{阴性}}$)NK细胞(g-NK),其中大于为或约70%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性,并且大于为或约70%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性。

99. 实施方案97或权利要求98的方法,其中(i)大于为或约80%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性,并且大于为或约80%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性,(ii)大于为或约90%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性,并且大于为或约90%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性,或(iii)大于为或约95%的g-NK细胞对于穿孔素呈阳性,并且大于为或约95%的g-NK细胞对于颗粒酶B呈阳性。

100. 实施方案98或权利要求99的方法,其中:

在所述对于穿孔素呈阳性的细胞中,所述细胞表达的如通过胞内流式细胞仪测量的穿孔素平均水平,根据平均荧光强度(MFI),是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的穿孔素的平均水平的至少为或约两倍;和/或

在所述对于颗粒酶B呈阳性的细胞中,所述细胞表达的如通过胞内流式细胞仪测量的颗粒酶B的平均水平,根据平均荧光强度(MFI),是FcR $\gamma^{\text{阳性}}$ 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少为或约两倍。

101. 实施方案1-100中任一项的方法,其中所述g-NK细胞组合物中大于10%的细胞能够对肿瘤靶细胞进行脱颗粒,任选地如通过CD107a表达来测量的,任选地其中在没有针对肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量脱颗粒。

102. 实施方案1-101中任一项的方法,其中,在存在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的情况下,在所述g-NK细胞组合物中的细胞中,大于为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%的细胞表现出脱颗粒,任选地如通过CD107a表达来测量的。

103. 实施方案1-102中任一项的方法,其中所述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, 其中干扰素 γ 或TNF- α 是在没有针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

104. 实施方案1-103中任一项所述的方法, 其中, 在存在表达靶抗原(靶细胞)的细胞和针对靶抗原的抗体的情况下, 在所述g-NK细胞组合物中的细胞中, 大于为或约15%、大于为或约20%、大于为或约30%、大于为或约40%或大于为或约50%产生效应细胞因子。

105. 实施方案104的方法, 其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

106. 实施方案104或实施方案105的方法, 其中所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

107. 实施方案1-106中任一项的方法, 其中所述g-NK细胞组合物已通过用辐照的HLA-E+饲养细胞培养的CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD56+细胞的体外扩增产生的, 其中所述CD3-/CD57+细胞或CD3-/CD55+细胞从供体受试者的生物样品中富集。

108. 实施方案107的方法, 其中所述供体受试者是CMV血清阳性。

109. 实施方案107或权利要求108的方法, 其中所述供体受试者具有CD16 158V/VNK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型, 任选地其中所述生物样品来自针对CD16158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人类受试者。

110. 实施方案107-109中任一项的方法, 其中来自所述供体受试者的外周血样品中至少为或约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C阳性), 并且所述外周血样品中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或低NKG2A(NKG2A阴性)。

111. 实施方案107-110中任一项的方法, 其中所述辐照的饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类。

112. 实施方案107-111中任一项所述的方法, 其中所述辐照的饲养细胞是221.AEH细胞。

113. 实施方案107-112中任一项的方法, 其中所述培养是在存在两种或更多种重组细胞因子的情况下进行的, 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。

114. 实施方案113的方法, 其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。

115. 实施方案113的方法, 其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

116. 实施方案1-106中任一项的方法, 其中所述g-NK细胞经基因工程化以敲除编码所述FcR γ 链的基因。

117. 实施方案116的方法, 其中所述敲除是引入对所述基因的基因破坏, 其中所述基因破坏导致在所述基因中的缺失、插入或突变。

118. 实施方案116或实施方案117的方法, 其中编码FcR γ 链的两个等位基因在所述工程化细胞中被破坏。

119. 实施方案116-118中任一项的方法, 其中所述基因破坏是通过核酸内切酶。

120. 实施方案119的方法, 其中所述核酸内切酶是与引导RNA组合的TAL核酸酶、巨核酸酶、锌指核酸酶、Argonaute核酸酶或CRISPR酶。

121. 实施方案120所述的方法, 其中所述核酸内切酶是与引导RNA组合的CRISPR/Cas9。

122. 实施方案116-121中任一项的方法, 其中所述g-NK细胞还包含编码异源CD16

的核酸。

123. 实施方案122的方法,其中所述异源CD16包含CD16激活性突变,其中所述突变导致对IgG1的亲合力更高。

124. 实施方案123所述的方法,其中所述异源CD16包含158V突变。

125. 实施方案116-124中任一项所述的方法,其中所述工程化g-NK细胞来源于从人类受试者中获得的原代细胞。

126. 实施方案1-125中任一项的方法,其中所述g-NK细胞组合物在不含血清的冷冻保存培养基中配制,所述冷冻保存培养基包含冷冻保护剂,任选地其中所述冷冻保护剂为DMSO,且所述冷冻保存培养基为5%至10% DMSO(v/v)。

127. 实施方案1-126中任一项的方法,每个剂量的g-NK细胞为或约为或约 1×10^8 个细胞至为或约 50×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物,任选地其中每个剂量的g-NK细胞为或约为 5×10^8 个细胞的g-NK细胞组合物,为或为约 5×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物,或为或为约 10×10^9 个细胞的g-NK细胞组合物。

128. 实施方案1-127中任一项的方法,其中所述受试者是人类受试者。

129. 实施方案1-128中任一项的方法,其中所述组合物中的NK细胞与受试者是同种异体的。

130. 一种工程化的自然杀伤(NK)细胞,其中所述NK细胞缺乏FcR γ 链的表达(g-NK细胞),其中所述g-NK细胞包含:

编码嵌合抗原受体(CAR)的异源核酸,所述CAR包含与所述第一抗原结合的细胞外结合结构域;以及

编码与第二抗原结合的可分泌的单克隆抗体的异源核酸。

131. 实施方案130的工程化NK细胞,其中所述第一抗原和第二抗原是不同的。

132. 实施方案130的工程化NK细胞,其中所述第一和第二抗原是相同的。

133. 实施方案130-132中任一项的工程化NK细胞,其中所述单克隆抗体是全长抗体。

134. 实施方案130-133中任一项所述的工程化NK细胞,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

135. 实施方案130-134中任一项的工程化NK细胞,其中所述CAR和所述单克隆抗体结合至相同抗原的不同表位。

136. 实施方案130-135中任一项的工程化NK细胞,其中所述第一和第二抗原由相同的靶细胞表达。

137. 实施方案136的工程化NK细胞,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

138. 一种药物组合物,其包含实施方案129-136中任一项所述的工程化NK细胞和药学上可接受的载体。

139. 实施方案138的药物组合物,其包含冷冻保护剂。

140. 实施方案138或实施方案139的药物组合物,其中所述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。

141. 实施方案139或实施方案140的药物组合物,其中所述冷冻保护剂为DMSO,并且所述冷冻保存培养基为5%至10% DMSO(v/v)。

142. 一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用实施方案138-141中任一项的药物组合物。

IX. 实施例

[0651] 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。

实施例1:g-NK细胞在不同细胞因子的存在下的扩增

[0652] 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。作为一种替代,分离可以通过CD3耗竭,然后CD56富集以便分离CD56^{阳性} NK细胞来进行。

[0653] 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 5×10^5 个细胞/mL,并且传代培养密度为 2×10^5 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200 μ g/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。

[0654] 在四种不同条件下扩增如上所述的富集的未冷冻保存的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。

[0655] 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(缺乏Fc ϵ R1 γ 的细胞,在本文中也互换地称为FcR γ)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)。

[0656] 总之,这些结果表明IL-21的存在改善了g-NK细胞的扩增。

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

[0657] 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。

A. 细胞介导的细胞毒性

[0658] 将扩增的NK细胞解冻后,在1 μ g/mL达雷妥尤单抗(抗-CD38)或1 μ g/mL埃罗妥珠单抗(抗-CD319)的存在下,将 10^4 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)。

[0659] 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。

[0660] 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。

B. 脱颗粒

[0661] 将扩增的NK细胞解冻后,在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,将 2.0×10^5 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2 μ L的VioGreen缀合的抗CD107a添加到共培养物中,在37 $^{\circ}$ C的CO₂培养箱中培养一小时,之后添加4 μ L含有莫能菌素的BD GolgiStop。对于细胞因子表达测定,添加6 μ L含有布雷菲德菌素A的BD GolgiStop。然后将细胞在37 $^{\circ}$ 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0.5 μ L的抗CD45抗体、0.5 μ L的抗CD3抗体和1 μ L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1 μ L的抗FcR γ 、2 μ L的抗穿孔素、2 μ L的抗颗粒酶B、2 μ L的干扰素- γ 和2 μ L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。

[0662] 表E1. 用于功能检测的抗体组。

管	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
脱颗粒(细胞毒性颗粒的释放)								
1	CD45	CD107a	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

[0663] 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。

[0664] 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。

C. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0665] 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。

[0666] 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。

D. 干扰素- γ 的表达

[0667] 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。

[0668] 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。

E. TNF- α 的表达

[0669] 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。

[0670] 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。

实施例3:g-NK细胞在附加细胞因子的存在下的扩增

[0671] 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。

[0672] 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。

[0673] 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。

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

[0674] 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。

A. 细胞介导的细胞毒性

[0675] 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。

[0676] 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。

B. 脱颗粒

[0677] 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。

[0678] 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。

C. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0679] 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。

[0680] 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。

D. 干扰素- γ 的表达

[0681] 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。

[0682] 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。

E. TNF- α 的表达

[0683] 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。

[0684] 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。

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

[0685] 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 ± 10.6 岁;8名男性和6名女性)。

[0686] 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^{阴性})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,除非另有说明。作为一种替代,富集NK细胞用于扩增可以通过CD3耗竭随后CD56富集以便分离CD56^{阳性}NK细胞来进行。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 2×10^5 个细胞/mL的密度接种NK细胞,并且以 2×10^5 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2:1221.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。

[0687] 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。

[0688] 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^{阳性}) (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 $1.6 \pm 0.4\%$ 。

A. g-NK细胞的扩增率

[0689] 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^{阴性}/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细胞的扩增率。

[0690] 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^{阴性}/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}/NKG2C^{阴性} NK细胞之间存在表型重叠,但它们不相同。

[0691] 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。

[0692] 总之,这些结果表明IL-21的存在改善了g-NK细胞的扩增。

B. 细胞介导的细胞毒性

[0693] 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。

[0694] 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。

C. 脱颗粒

[0695] 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。

[0696] 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。

D. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0697] 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。

[0698] 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。

[0699] 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。

E. 干扰素- γ 的表达

[0700] 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。

[0701] 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。

F. TNF- α 的表达

[0702] 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。

[0703] 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。

G. g-NK供体的效应功能比较

[0704] 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。

实施例6:g-NK细胞在IL-21/抗IL-21复合物的存在下的扩增

[0705] 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。

[0706] 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。

实施例7:在冷冻保存之后g-NK细胞效应子功能的维持

[0707] 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^{阴性}/CD57^{阳性}的NK细胞与经辐照的221.AEH饲养细胞以2:1 221.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。

A. 脱颗粒

[0708] 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。

[0709] 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。

B. 穿孔素和颗粒酶B的表达

[0710] 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。

C. 干扰素- γ 的表达

[0711] 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。

[0712] 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。

D. TNF- α 的表达

[0713] 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。

[0714] 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。

实施例8: 评估g-NK细胞与cNK细胞相比的体内持久性

[0715] 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。

[0716] 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)。

[0717] 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-PrkDc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 小鼠 (n=9, 每组3只) 中。为了提供NK细胞支持, 每三天经由I.P. 途径施用约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。

表E2. 持续性研究设计

组号	臂	小鼠数量	NK天数	采血天数
1	IL-15+新鲜第14天g-NK	3	1	6, 16, 26, 31 (处死)
2	IL-15+冷冻第14天g-NK	3	1	6, 16, 26, 31 (处死)
3	IL-15+冷冻第14天cNK	3	1	6, 16, 26, 31 (处死)

[0718] 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) 以及在第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。

[0719] 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。

实施例9:评估g-NK细胞上的CD38和SLAMF7以及g-NK细胞的同种相杀活性

[0720] 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。

[0721] 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。

[0722] 表E3.流式细胞术组测定NK、MM和Raji细胞上的CD20、CD38和SLAMF7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
仅MM	CD45	CD20		CD38	7-AAD		SLAMF7	
仅MM CD38 FMO	CD45	CD20			7-AAD		SLAMF7	
仅 MM SLAMF7 FMO	CD45	CD20		CD38	7-AAD			
NK + Raji	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK + Raji CD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅Raji	CD45	CD20			7-AAD			
仅 Raji CD20 FMO	CD45				7-AAD			

*FcRg是细胞内表位

[0723] 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。

[0724] 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。

[0725] 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)。

[0726] 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 $85\pm4\%$,并且对于cNK供体为 $2\pm1\%$ 。

[0727] 为了评估同种相杀,在 $1\mu\text{g/mL}$ 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°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。

[0728] 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。

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

[0729] 通过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。

[0730] 将大约 5×10^5 个荧光素酶标记的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。

[0731] 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-荧光素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。

表E4.MM功效研究设计

组号	臂	小鼠数量	抗体施用天数	NK细胞施用天数
1	溶媒对照	8	N/A	N/A
2	g-NK I.V.+ 10 ug达雷妥尤单抗 I.P.+IL-15I.P.*	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
3	cNK I.V.+ 10 ug达雷妥尤单抗 I.P.+IL-15I.P.*	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42

[0732] 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。

[0733] 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)。

[0734] 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)。

[0735] 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。

实施例11:g-NK替代表面标记物的鉴定

[0736] 进行研究以鉴定胞外表面标记物的组合,这些胞外表面标记物可用作替代表面标记物以鉴定g-NK细胞,这些细胞对于胞内标记物FceRI γ 呈阴性(FcR γ 阴性)。通过流式细胞术,通过FceRI γ 的胞内染色以及通过CD45、CD3和CD56的胞外染色确定人外周血样本中g-NK细胞的百分比,以鉴定g-NK细胞亚群CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}/FcR γ 阴性。如图16所示,在样本中的g-NK细胞中,具有NK细胞表型CD45^{阳性}/CD3^{阴性}/CD56^{阳性}的细胞和具有CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}或NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性}胞外表面表型的细胞与样本中g-NK细胞的存在高度相关。具体地,CD16^{阳性}/CD57^{阳性}/CD7^{微弱/阴性}/CD161^{阴性}或NKG2A^{阴性}/CD161^{阴性} NK细胞亚群中g-NK细胞的百分比均大于80%。。

实施例12:用CD20 CAR转导g-NK细胞的可行性和细胞毒性功效

[0737] 进行研究以评估在g-NK细胞中工程化的嵌合抗原受体(CAR)的表达和效力。基本上如实施例5中所述,在500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21的存在下,通过与经辐照的221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH:NK细胞比例共培养,从来自外周血的富集的CD3^{阳性}/CD57^{阳性} NK细胞扩增G-NK细胞。作为一种替代,分离可以按照如下进行:先进行CD3耗竭,然后进行CD56富集,以分离出CD56^{阳性} NK细胞,随后如所述的,在500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21的存在下,通过与经辐照的221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH:NK细胞比例共培养。使用NeonTM转染系统电穿孔细胞。电穿孔前用PBS洗涤细胞,并以 4.8×10^7 /mL的细胞密度再悬浮于Opti-MEMTM培养基中。将100 μ L的细胞与14.4 μ g的1mg/mL GFP mRNA或CAR-CD20 mRNA混合。CAR-CD20由结合CD20多肽(SEQ ID NO:37)、IgG4 Fc间隔子(SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:39)、CD28胞内共刺激信号传导结构域(SEQ ID NO:39)和CD3 ζ 主要信号传导结构域(SEQ ID NO:41)的鼠抗CD20(Leu16) scFv组成CAR的氨基酸序列在SEQ ID NO:42(GenBank号KX055829.1)中所示,并且还在5'端产生HA标签。抗CD20 mRNA如SEQ ID NO:45中所示。

[0738] 将g-NK细胞和mRNA的混合物以1820(20ms)的第一脉冲进行电击,随后以500V(100ms)的第二脉冲进行电击。然后在含有500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21的2mL的NK MACS[®]培养基中培养细胞。将细胞在37°C与5% CO₂下培养24小时。

[0739] 在温育之后,通过流式细胞术分析细胞以评价GFP和CAR-CD20表达的水平。来自使用不同供体的两个单独实验的g-NK细胞的GFP和CD20-CAR的转导后表达示于图17中。GFP或CAR-CD20阳性细胞的百分比报告为表达GFP或CAR-CD20的存活细胞的百分比。

[0740] 通过在利妥昔单抗(Rituxan[®])的存在或不存在下将细胞与60,000个Raji淋巴瘤细胞(靶)以不同的效应子比靶(E:T)比例温育来分析有或没有CAR-CD20的g-NK细胞(效应子)的细胞毒性。所用利妥昔单抗(Rituxan[®])的浓度为5 μ g/ml。用APC缀合的小鼠抗人CD19mAb对

Raji细胞进行预染色。通过用含有10% FBS和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基(测定培养基)洗涤去除残留的染料。通过流式细胞术验证预染色的Raji细胞,以确认所有靶细胞都被成功标记。

[0741] 将第17天扩增的g-NK细胞或电穿孔后36小时的CAR-CD20 g-NK细胞与预染色的Raji靶细胞以E:T比例0.5:1、2.5:1和5:1在1mL的测定培养基中混合。将混合物在300g下沉淀5分钟,然后在37°C与5% CO₂下一起温育4小时。使用4色流式细胞术评估细胞毒性。为了鉴定NK细胞(CD3^{阳性}/CD56^{阳性}),使用PE缀合的小鼠抗人CD56 mAb和FITC缀合的小鼠抗人CD3 mAb。为了区分活靶细胞(CD19^{阳性}/PI^{阴性})和死靶细胞(CD19^{阳性}/PI^{阳性}),使用碘化丙锭(PI)。

[0742] 图18证明在利妥昔单抗(Rituxan[®])的存在或不存在下,有或没有CD20-CAR的g-NK细胞针对Raji淋巴瘤细胞的效力。添加CD20-CAR增强了g-NK细胞作为单一疗法的效力。不管CD20-CAR是否表达,利妥昔单抗(Rituxan[®])的添加也将g-NK细胞的效力增强至相似水平。

[0743] 该结果证明,CAR在缺乏FcR γ 链表达的g-NK细胞中是有功能的。该结果进一步证实了令人惊讶的发现,即CAR的添加不会破坏通过IgG1 mAb经由CD16接合的g-NK细胞的ADCC机制。因此,除了CAR工程化的g-NK细胞单一疗法的活性之外,这些结果支持用CAR和Fc靶向剂(诸如IgG1 mAb)工程化的g-NK细胞的组合疗法,包括使用不同于mAb的CAR靶向抗原的方法。取决于肿瘤的抗原表达和可能的抗原损失,此类双靶向策略可潜在地在功能上是相加的或补偿性的。

实施例13:具有CD20 CAR的g-NK细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)功效

[0744] 进行了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)研究,以评估在g-NK细胞中工程化的嵌合抗原受体(CAR)与CD38抗体组合的效力。基本上如上述所述,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下,通过与经辐照的221.AEH饲养细胞共培养,从外周血中扩增g-NK细胞。扩增产生原始NK细胞群体,其含有92%g-NK细胞。在扩增过程的第18天,收获g-NK细胞。在第19天,即一天后,50%的收获的细胞被电穿孔。

[0745] 在电穿孔前用PBS洗涤细胞,并以 2.0×10^7 /mL的细胞密度重悬在Opti-MEM[™]培养基中,同时加入或不加入30μg/mL的CAR-CD20mRNA质粒。此实验中使用的示例性CAR-CD20由结合CD20多肽的小鼠抗CD20(Leu16) scFv(SEQ ID NO:37)、IgG4 Fc间隔子(SEQ ID NO:38)、CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:39)、CD28胞内共刺激信号结构域(SEQ ID NO:39)和CD3ζ主要信号传导结构域(SEQ ID NO:41)组成。CAR的氨基酸序列在SEQ ID NO:42(GenBank No.KX055829.1)中所示,并且还在5'端产生HA标签。抗CD20 mRNA在SEQ ID NO:45中所示。应当理解,其他靶向人CD20的抗CD20 CAR也可使用并且是本领域技术人员已知的。此外,在不希望受理论束缚的情况下,其他靶向靶细胞上其他抗原的CAR也可使用,例如抗CD19的CAR。选择合适的且靶向已知在靶细胞上表达的第一和第二(不同的)抗原的CAR和抗体是在本领域技术人员的能力范围内的。

[0746] 使用Neon[™]电穿孔器对细胞进行电穿孔。对g-NK细胞和mRNA的混合物进行电击,第一个脉冲为1820V(20ms),随后进行500V(100ms)的第二脉冲。然后细胞在1mL含有RPMI、10% FBS、500IU/mL的IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21的完全培养基中在37°C和5% CO₂培养24小时。

[0747] 如图19所示,电穿孔后,31.4%的存活g-NK细胞表达CD20 CAR。细胞群体没有被进

一步分选。

[0748] 分开培养Raji淋巴瘤细胞至第4代。如图20B所示,通过流式细胞术确认Raji细胞同时表达CD20和CD38。为了鉴定Raji细胞,使用PE-Cy7标记的抗CD19(图20A)。为了鉴定CD20和CD38的表达,使用APC标记的、Rituxan®结合的抗人IgG和APC标记的、达雷妥尤单抗结合的抗人IgG(图20B)。

[0749] 将 1.0×10^5 个Raji细胞置于含有或不含有 $1 \mu\text{g/mL}$ 达雷妥尤单抗的15mL试管中。 $1 \mu\text{g/mL}$ 达雷妥尤单抗的浓度远远高于达雷妥尤单抗与Raji细胞上CD38结合的EC50;该浓度应确保Raji细胞上的CD38被完全饱和。将含有或不含CD20 CAR的g-NK细胞以0.05:1至5:1的特定效应细胞与靶细胞比例添加到Raji细胞中。对于具有CD20 CAR的g-NK细胞,由于没有对细胞进行进一步分选,因此该细胞群体是这样的群体,即大约31.4%的加入了Raji细胞的g-NK细胞表达CD20 CAR。将含有或不含CD20 CAR的g-NK细胞和Raji细胞以300xG离心5分钟,并在37°C和5% CO₂下一起孵育4小时。

[0750] 4小时孵育后,轻轻倒出孵育培养基并进行流式细胞术检测。通过流式细胞术使用CD19和碘化丙啶(PI)鉴定存活的靶标(CD19^{阳性}/PI^{阴性})和死亡靶标(CD19^{阳性}/PI^{阳性})Raji细胞。

[0751] 图21证明了在存在或不存在抗CD38抗体(例如,达雷妥尤单抗)的情况下,含有或不含CD20 CAR的g-NK细胞对Raji细胞的功效。ADCC功效,如通过每种条件下Raji细胞的死亡百分比体现的。所示百分比不包括非ADCC引起的自发Raji细胞死亡的百分比。具体地,图21A显示了在0.05:1效应细胞与靶细胞比例下每种条件下Raji细胞死亡的百分比,图21B显示了在0.05:1效应细胞与靶细胞比例下每g-NK细胞所杀伤的Raji细胞的数量。

[0752] 结果表明,与对照g-NK细胞相比,CD20 CAR的表达以及达雷妥尤单抗的添加,无论是单独还是组合,在所有的效应细胞与靶细胞比例(E:T)下,都增强了ADCC。令人惊讶的是,在所有的效应细胞与靶细胞比例下,在存在达雷妥尤单抗的情况下,表达CD20CAR的g-NK细胞(“CD20 CAR g-NK+达雷妥尤单抗”)的Raji细胞死亡的百分比最高。也就是说,在所有测试的效应细胞与靶细胞比例下,当CD20 CAR g-NK细胞与达雷妥尤单抗组合使用时,Raji细胞死亡是最高的。

[0753] 如图21A所示,在0.05:1E:T条件下(即1个NK细胞对20个肿瘤细胞),观察到ADCC的增加最大。与较高的E:T比例相比,这种低E:T比例最能代表体内条件。单独的对照g-NK细胞(“g-NK”)杀死1.83%的Raji细胞。相反地,表达CD20 CAR的g-NK细胞(“CD20 CAR g-NK”)和非表达CD20 CAR的g-NK细胞在达雷妥尤单抗(“g-NK+Dara”)的存在下分别杀死3.4%和6.57%的Raji细胞。表达CD20 CAR的g-NK细胞在达雷妥尤单抗(“CD20 CARg-NK+Dara”)的存在下杀死13.1%的Raji细胞,这分别比CD20 CAR g-NK细胞或非CD20 CAR g-NK细胞连同达雷妥尤单抗的情况多约四倍或两倍。

[0754] 另外,在0.05:1E:T下,每个g-NK细胞杀死的Raji细胞数量在图21B中所示。在0.05:1E:T下,表达CD20 CAR的g-NK细胞(“CD20 CARg-NK”)的杀伤能力为每个g-NK细胞1.3个Raji细胞,而非表达CD20 CAR的g-NK细胞在达雷妥尤单抗的存在下(“g-NK+Dara”)的杀伤能力为0.68个Raji细胞。表达CD20 CAR的g-NK细胞与达雷妥尤单抗的组合使得杀伤能力增加至每个g-NK细胞2.6个Raji细胞。

[0755] 此数据表明,当CD20 CAR与达雷妥尤单抗组合使用时,观察到g-NK细胞产生协同效应,使这些g-NK细胞的细胞毒性增强至超过了两种治疗单独使用时的细胞毒性总和。

CD20 CAR g-NK细胞的杀伤能力达到每个g-NK细胞1.3个Raji细胞,而非表达CD20CAR的g-NK细胞在达雷妥尤单抗的存在下的杀伤能力小于每个g-NK细胞一个肿瘤细胞。CD20 CAR与达雷妥尤单抗的组合,不仅呈现出累加的细胞毒性,而且使每个NK细胞杀死的肿瘤细胞增加到超过2.5个,这表明当表达CD20 CAR的g-NK细胞在有达雷妥尤单抗存在时,具有协同效应并且增强了连续杀伤能力。

[0756] 此结果证实了一项惊人的发现,即向g-NK细胞加入CAR,联合分别针对第一和第二抗原的抗体,与仅添加CAR或仅添加抗体相比,产生了一种具有增强的协同细胞毒性功效的组合疗法。值得注意的是,即使使用了饱和剂量的达雷妥尤单抗(其预计会导致最大程度的靶向CD38的ADCC),仍取得了这些结果。在不希望受理论束缚的情况下,这些结果表明,这种协同效应可能是由于抗原之间的随机相互作用所致,从而支持对靶细胞(如癌症细胞)上的两种不同抗原进行靶向。此外,本文的结果表明,即使CAR工程化的T细胞和抗体靶向都通过相同的CD3 ζ 信号传导通路进行信号传导,经由ADCC的抗体导向的靶向在CAR工程化的T细胞中并未受到损害。这些结果,以及g-NK细胞的高效活性,支持了将CAR工程化的g-NK细胞与抗体组合的组合疗法作为一种多靶点方法用于对靶细胞(如癌细胞)进行细胞毒性杀伤的临床应用价值。

[0757] 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。

序列表

#	序列	注释
1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	人 IL-2(成熟 ; UniProt P60568)
2	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLII LANNSSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS	人 IL-15(成熟 ; UniProt P40933)
3	HKSSSQGQDRHMIRM RQLIDIVDQLKNYVNDL VPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANT GNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCP SCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTH GSEDS	人 IL-21(成熟 ; UniProt Q9HBE4)
4	QGQDRHMIRM RQLIDIVDQL KNYVNDLVPE FLPAPEDVET NCEWSAFSCFQKAQLKSANT GNNERIINVS IKKLKRKPPS TNAGRRQKHR LTCPCDSYEKKPPKEFLER FKSLLQKMIH QHLSSRTHGS EDS	IL-21
5	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPNWVNVISDLKKI EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSSLSSNGNV TESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKMA LIVLGGVAGLLFIGLGIFF	膜结合的IL-15 (mbIL-15)
6	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQDRHMIRM RQLI DIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAF SCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPST NAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKVSTLSFIESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGLGMALIVLGGVAGLLFIGLGIFF	膜结合的IL-21 (mbIL-21)
7	MALPVTALL PLALLHAAR PNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTSTTPA PRPPTAPTASQPLSLRPE ACRPAAGGAV	膜结合的IL-15 (mbIL-15)

#	序列	注释
	HTRGLDFACD IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYC	
8	MALPVTALLLPLALLLHAARPNWVNVISDLKKI EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVSPF TA	膜结合的IL-15 (mbIL-15)
9	ATGAGAATTT CGAAACCACA TTTGAGAAGT ATTTCCATCC AGTGCTACTTGTGTTTACTT CTAAACAGTC ATTTTCTAAC TGAAGCTGGC ATTCATGTCTTCATTTTGGG CTGTTTCAGT GCAGGGCTTC CTAAAACAGA AGCCAAC TGGGTGAATGTAA TAAGTGATT GAAAAAAATT GAAGATCTTA TTCAATCTATGCATATTGAT GCTACTTTAT ATACGGAAAG TGATGTTTAC CCCAGTTGCA AAGTAACAGC AATGAAGTGC TTTCTCTTGG AGTTACAAGT TATTTCACTT GAGTCCGGAG ATGCAAGTAT TCATGATACA GTAGAAAATC TGATCATCCT AGCAAACAAC AGTTTGTCTT CTAATGGGAA TGTAACAGAA TCTGGATGCA AAGAATGTGA GGAAC TGGAG GAAAAAATA TTAAAGAATT TTTGCAGAGT TTTGTACATA TTGTCCAAAT GTTCATCAAC ACTTCTTGA	IL-15核苷酸
10	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR	CD28铰链跨膜结构域
11	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YC	CD8铰链跨膜结构域
12	MALPVTALLLPLALLLHAARP	CD8 α 信号肽
13	MLLLVTSLLL CELPHPAFL IP	GM-CSFR α 信号肽
14	MRLPAQLLGL LMLWVPGSSG	IgK信号肽
15	MALIVLGGVAGLLFIGLGIFF	CD4跨膜结构域
16	U A AUUU CU ACUCUU GU AG AU	Cpfl crRNA支架序列
17	ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG	引物
18	GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA	引物
19	ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT	引物
20	ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC	引物
21	CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT	引物
22	GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAAT	引物
23	GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAA	引物
24	GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCA	引物
25	CCAAAAGCCACACTCAAAGAC	引物
26	ACCCAGGTGGAAAGAATGATG	引物

#	序列	注释
27	AACATCACCATCACTCAAGGTTTGG	引物
28	CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAA	引物
29	TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C	引物
30	CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAC	引物
31	GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQ GAYSPEDNSTQWFHNESSLISSQASSYFIDAATVD DSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPR WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKG RKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFSGSKN VSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVM VLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKW RKDPQDK	CD16 (F158)
32	MWQLLLPTALLLVSA	信号肽
33	GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQ GAYSPEDNSTQWFHNESSLISSQASSYFIDAATVD DSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPR WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKG RKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVSGSKN VSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVM VLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKW RKDPQDK	CD16 (V158或158V+)
34	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFL YGIVLT LLYCRLKIQVRKAAITSYEK SDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	FcR γ
35	IVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGS SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIK	抗CD20 (Leu16) VL
36	GAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSLD	抗CD20 (Leu16) VH
37	IVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGS SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGG SSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGT TVTVSSLD	抗CD20 (Leu16) scFv
38	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKM	IgG4 Fc间隔子
39	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 跨膜结构域
40	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 共刺激信号传导结构域
41	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	CD3 ζ 信号传导结构域

	GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
42	IVLTQSPAILSASPGKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGS SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGSTSGGSGGGSGGGG SSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGT TVTVSSLDESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPGSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKMF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗CD20 CAR Genbank 号 KX055829.1
43	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	IgK信号肽
44	YPYDVPDYA	HA标签
45	atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctcgggtccaggtccacaggtgac taccatacagatgtccagattacgctattgtgctgacccaatcctcagctatcctgctgcatct ccaggggagaaggtcacaatgacttcagggccagctcaagtgtaaattacatggactggt accagaagaagccagatcctccccaacccctggatttatgccacatccaacctggcttct ggagtccctgctcgttcagtggcagtggtgctgggacctcttactctctcacaatcagcaga gtggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgaggatttaaccacccacgttcg gaggggggaccaaagctggaataaaaaggcagtagcgggtggtggctccggggggcgggt tccggtggggggcggcagcagcgaggtgcagctgcagcagctggggctgagctggtgaa gcctggggcctcagtgaagatgctctgcaaggcttctggctacacattaccagttacaatatg cactgggttaaagcagacacctggacagggcctggaatggattgagctatttatccaggaa atggtgatacttctacaatcagaagttcaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcct ccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcggactattactgt gcaagatctaattattacggtagtagctactggttctcgtatgctggggcgcagggaccacg gtcacctgtcctcactcagcaatctaagtagcggaccgacctgcccccttgcctgcccc cgagttcctggggcgaccagcgtgttctgttcccccaagccaaggacacctgatg atcagccggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgagccaggaagatcccgga ggtccagttcaattgtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccag agaggaacagttcaacagcacctaccgggtggtgtctgtgctgacctgctgcaccaggac tggctgaacggcaaagaatacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccagcagcctc gaaaagaccatcagcaaggccaaggccagcctcgcgagccccaggtgtacacctgcct ccctcccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggttct accccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaactacaag accacccctcccgtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagccggtgacctggg acaagagccggtggcaggaaggcaacgtctttagctgcagcgtgatgcagaggccctgc acaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccctgggcaagatgttctgggtgctggtg gtggtggggggggtgctggcctgtacagcctgctggtgacagtggtccttcatcatctttgg gtgctgggagcaagcggagcagaggcgccacagcactacatgaacatgaccccagac ggcctggccccaccggaagcactaccagccctacgccccaccagggaactttgccgct acagaagccgggtgaagttcagcagaagcggcagccccctgcctaccagcagggccag aatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataag	抗CD20 CAR (用于三联RNA)

	cggagaggccgggaccctgagatggcgccgaagcctcgccggaagaacccccaggaa ggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcag aaggcgagcgaggcgccgggcaaggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccg ccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaagggtga	
46	qvqlvqsgaevkpkpgssvkvsckafggtfssyaiswvrqapggglewmgiirflgian yaqkfqgrvtliadkstntaymelsslrstedavyycagepgerdpdaviwgqgtmvt vss	抗CD38 VH
47	evqlvqsgaevkpkpgeslkiscksgysfsnywigwvrqmpgkglewmgiiphyds daryspsfqgqvtfssadksistaylqwsslkasdtamyycarhvgwgsrywyfd lwgrgtlvtvss	抗CD38 VH
48	eivltqspdfqsvtpkekvititcrasqsigsslhwyqqkpdqspkllikyasqsfsgvpsrf sgsgsgtdflitinsleadaatyychqssslpytfgggtkleik	抗CD38 VL
49	diqmtqspsslsasvdrvtitcrasqgisnylawfqkpgkapksliyaasslqsgvpsrf sgsgsgtdflitisslqpedfatyyccqynsyptyfgggtkleik	抗CD38 VL
50	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ
51	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	4-1BB 共刺激结 构域
52	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS	CD28 共刺激结 构域
53	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEIT	抗CD19 VL
54	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP RKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	抗CD19 VH
55	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	惠特洛接头 (Whitlow linker)
56	GGGGSGGGSGGGGS	GS接头
57	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSTSGSGKPGSGEGS TKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSS	抗CD19 scFv
58	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGGGGSGGGSGGGG SEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	抗CD19 scFv
59	ESKYGPPCPPCP	IgG4铰链
60	TTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPE	CD8铰链
61	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYC	CD8跨膜结构域
62	DIVLTQSPASLMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQ	抗 BCMA

	QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVE EDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIK	C11D5.3 VL
63	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAP GKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAY LQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSS	抗 BCMA C11D5.3 VH
64	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVE EDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG STKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWV KRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETS STAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTV SS	抗 BCMA C11D5.3 scFv
65	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEE DDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIK	抗 BCMA C12A3.2 VL
66	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQ APGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSASTA YLVINNLYKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALT VSS	抗 BCMA C12A3.2 VH
67	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEE DDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG STKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNW VKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETS STAYLVINNLYKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALT V S	抗 BCMA C12A3.2 scFv
68	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAP GKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAY LQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSS	抗 BCMA BCMA02 VH
69	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEE DDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIK	抗 BCMA BCMA02 VL
70	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEE DDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG STKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWV KRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETS STAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTV SS	抗BCMA02 scFv
71	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD	CD8铰链
72	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKP	CD28铰链
73	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8跨膜结构域
74	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28跨膜结构域
75	ESKYGPSPSCP	IgG4铰链
76	MALPVTALLPLALLHAARPDIMQTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHSTRHSGVPS RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAK	抗CD19 CAR

	HYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR	
77	MALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLS VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY NSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	替沙来塞 (Tisagenlecleucel) CD19 CAR 氨基酸序列
78	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRV ISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSL SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSSESKEYGPPCPPCPMFVW LVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	利基迈仑赛 (Lisocabtagene maraleucel) CD19 CAR 氨基酸序列
79	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRV ISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSL SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSAAAIEVMYPPPYLDNE KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGLACYS SLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	阿基仑赛 (Axicabtagene ciloleucel) CD19 CAR 氨基酸序列
80	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPG SSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED AATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIK	抗CD20 (Leu16) VL
81	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTT VTVSS	抗CD20 (Leu16) VH

82	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPG SSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED AATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGS TKGEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWG AGTTVTVSS	抗CD20 (Leu16) scFv
83	MALPVTALLPLALLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGT KVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGPGLVKPSSETL SLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTY YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD RGDTILDVWGQGTMTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	抗BCMA CAR
84	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGT MTVSS	抗CD22 VH
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQTIWSYLNWYQQR GKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGGTDFTLTISSLQAE DFATYYCQQSYIPQTFGQGTKEIK	抗CD22 VL
86	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSK WYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGT MTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGGTDFTLTISSLQAEFATYYCQQSYIPQTFGQGT KLEIK	抗CD22 scFv
87	QVQLQQSGPGMVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSVAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYAVSMKSRITINPDNTK NQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGT MTVSS	抗CD22 VH
88	DIQMIQSPSSLSASVGDRVITITCRASQTIWSYLNWYRQRP GEAPNLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGGTDFTLTISSLQAE DFATYYCQQSYIPQTFGQGTKEIK	抗CD22 VL
89	QVQLQQSGPGMVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSVAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYAVSMKSRITINPDNTK NQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGT MTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMIQSPSSLSASVGDRV TITCRASQTIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGGTDFTLTISSLQAEFATYYCQQSYIPQTFGQGT KLEIK	抗CD22 scFv

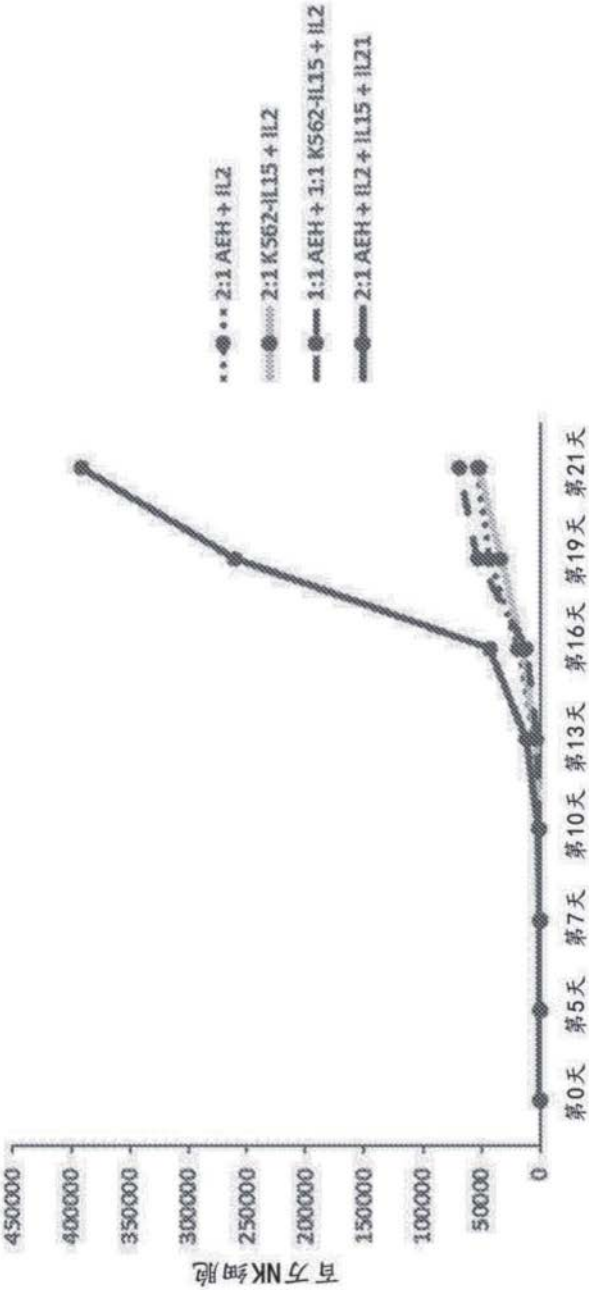


图1A

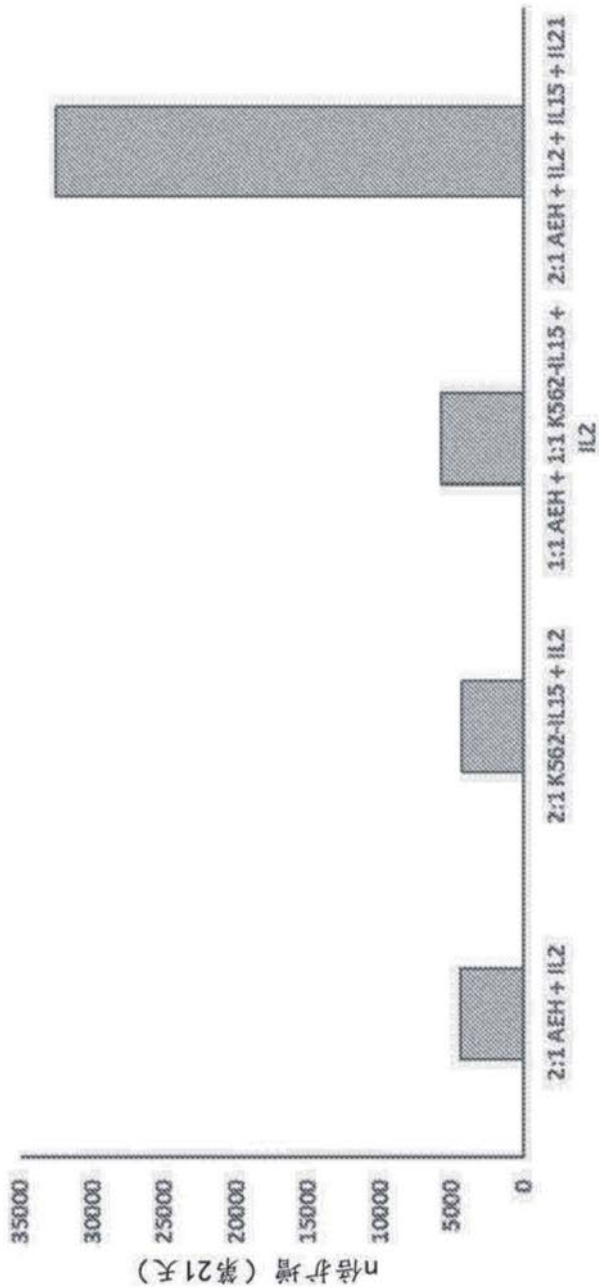


图1B

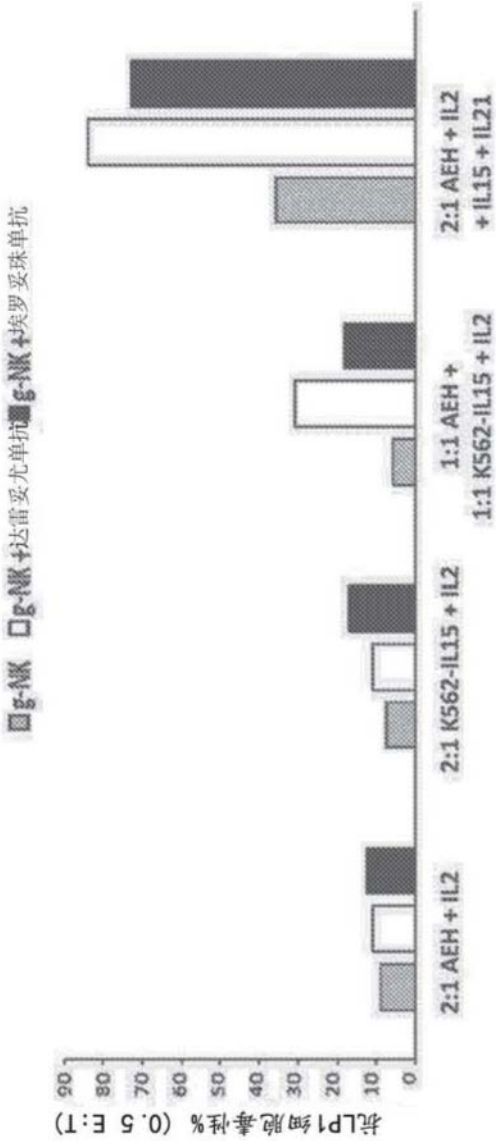


图2A

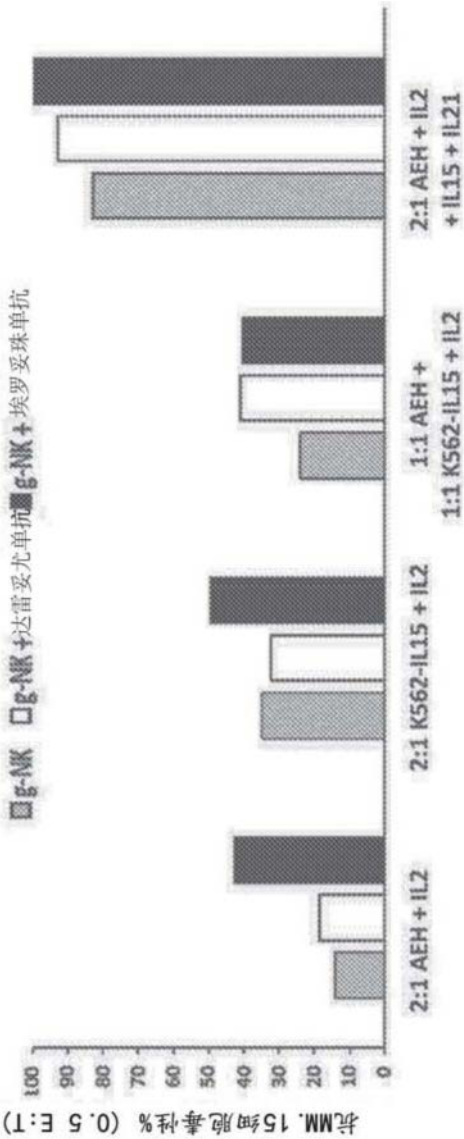


图2B

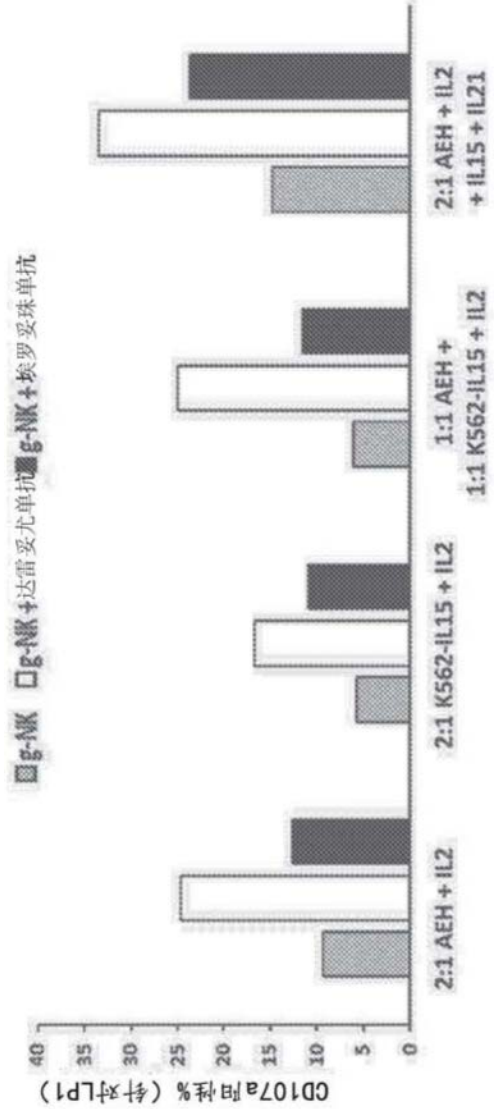


图3A

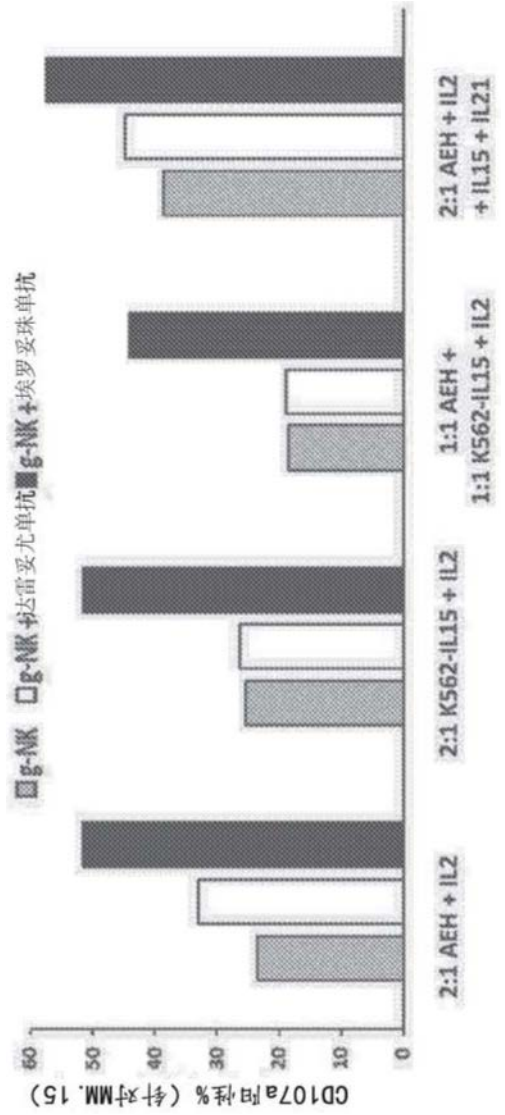


图3B

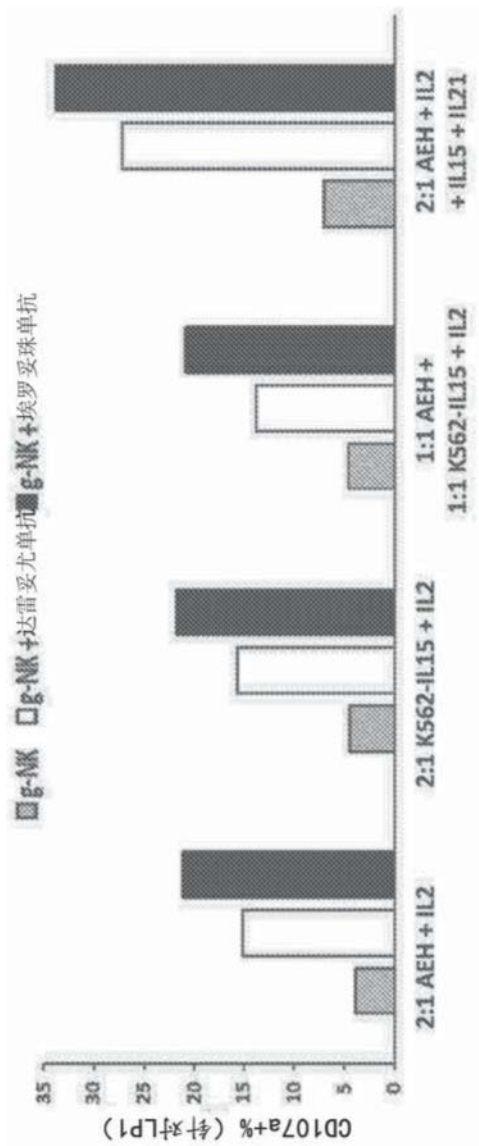


图3C

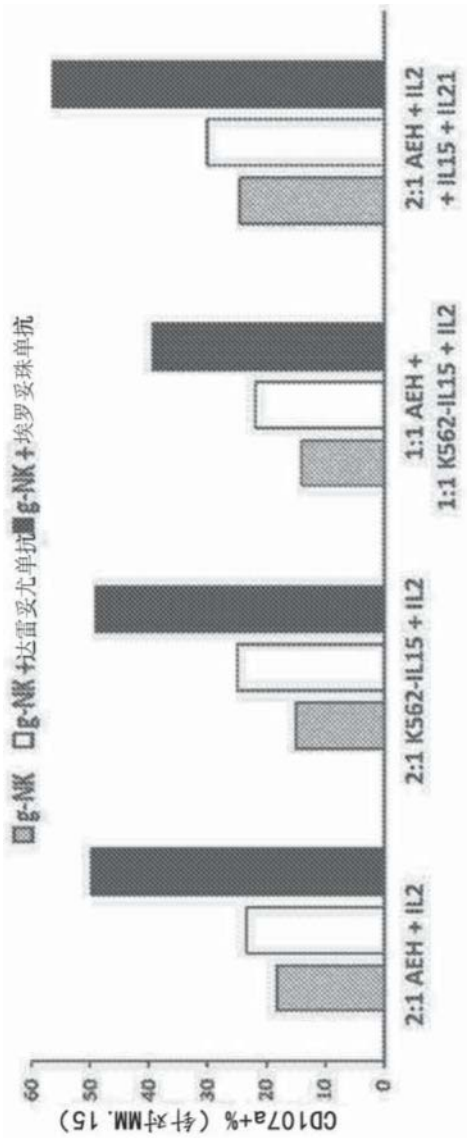


图3D

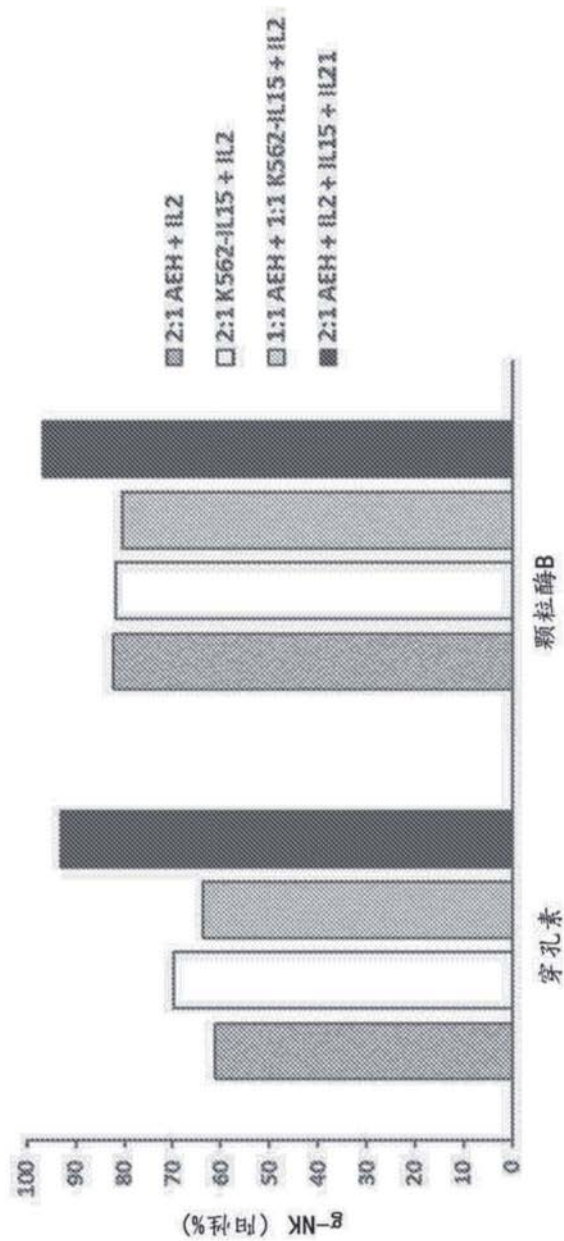


图4A

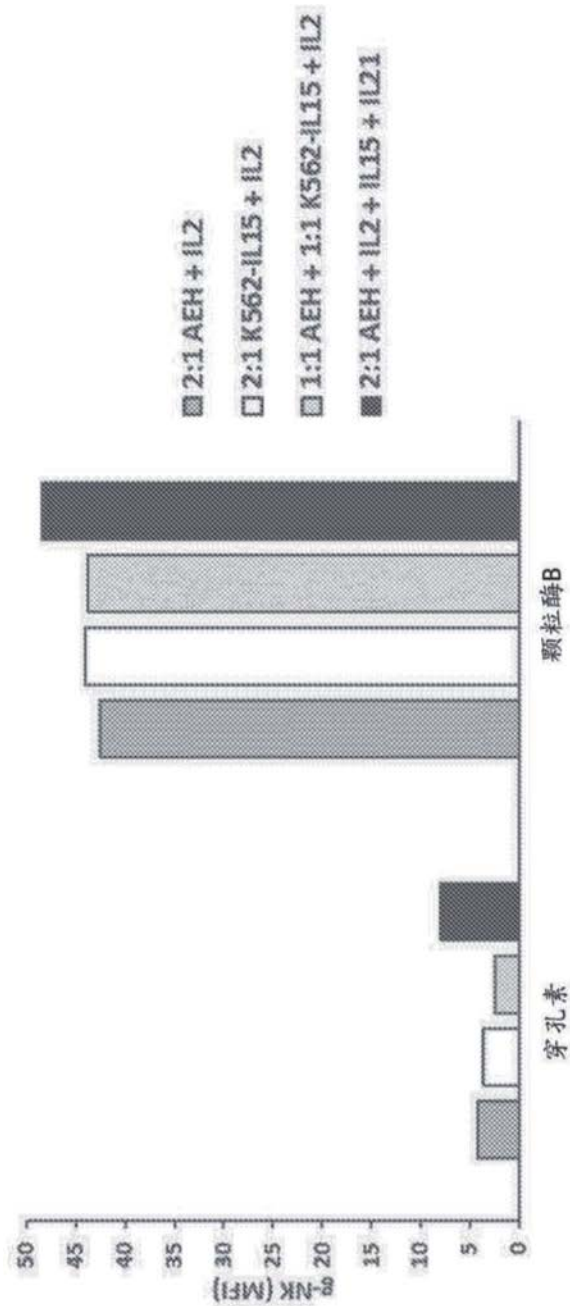


图4B

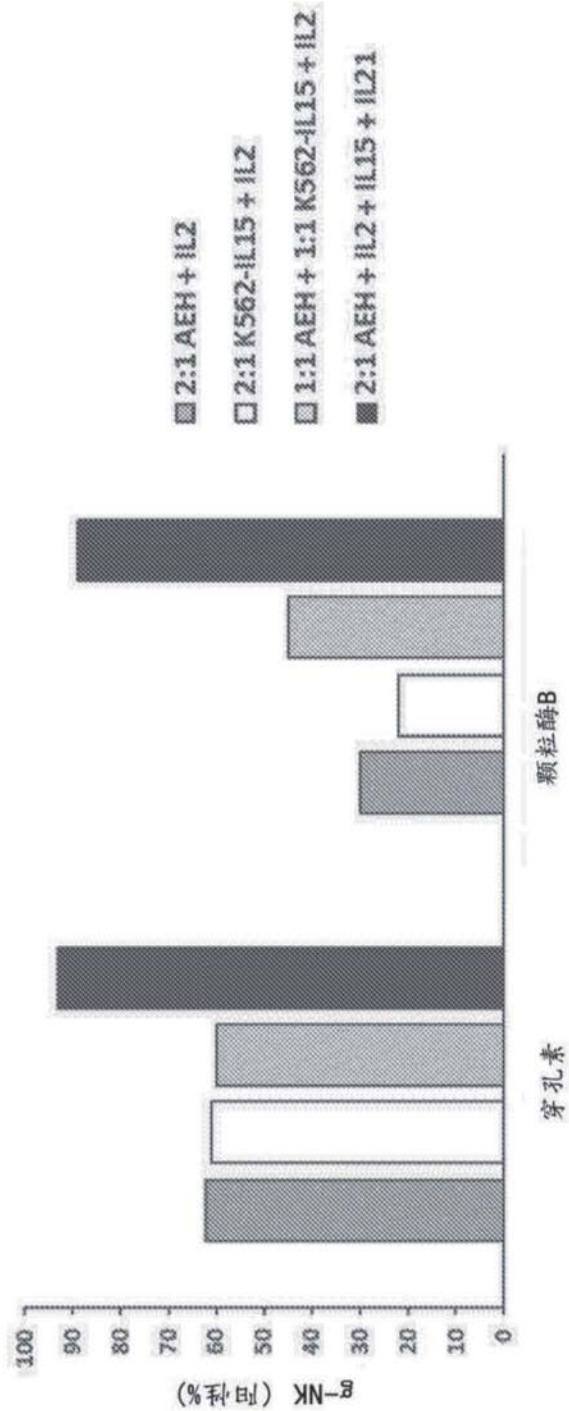


图4C

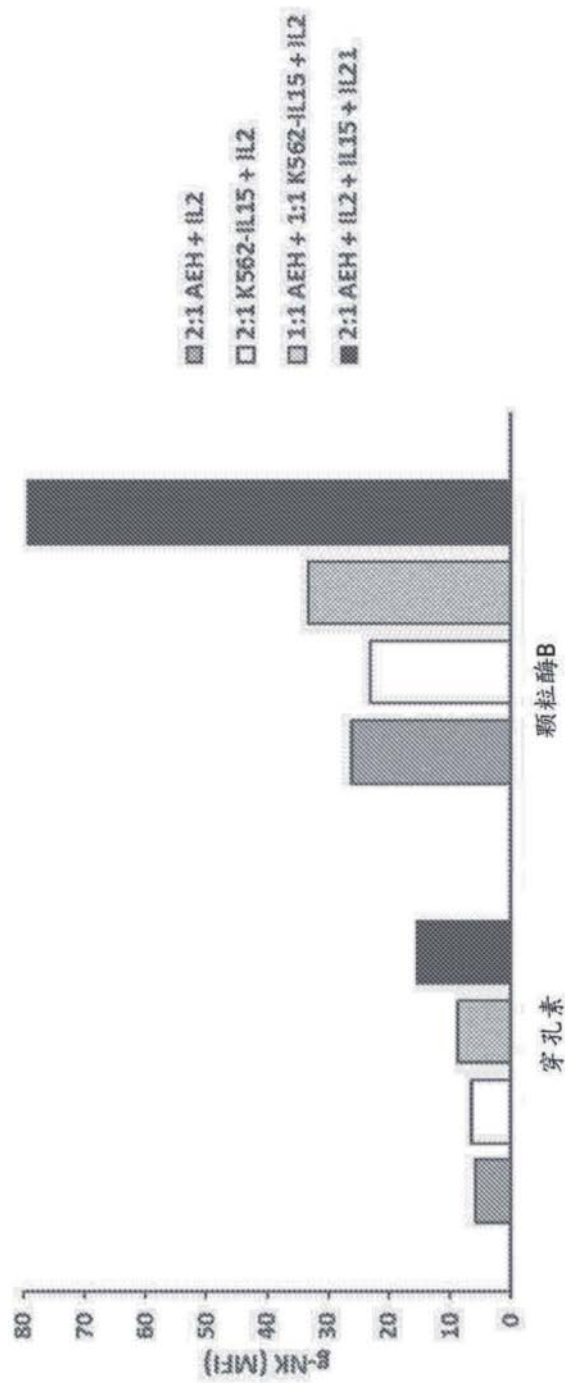


图4D

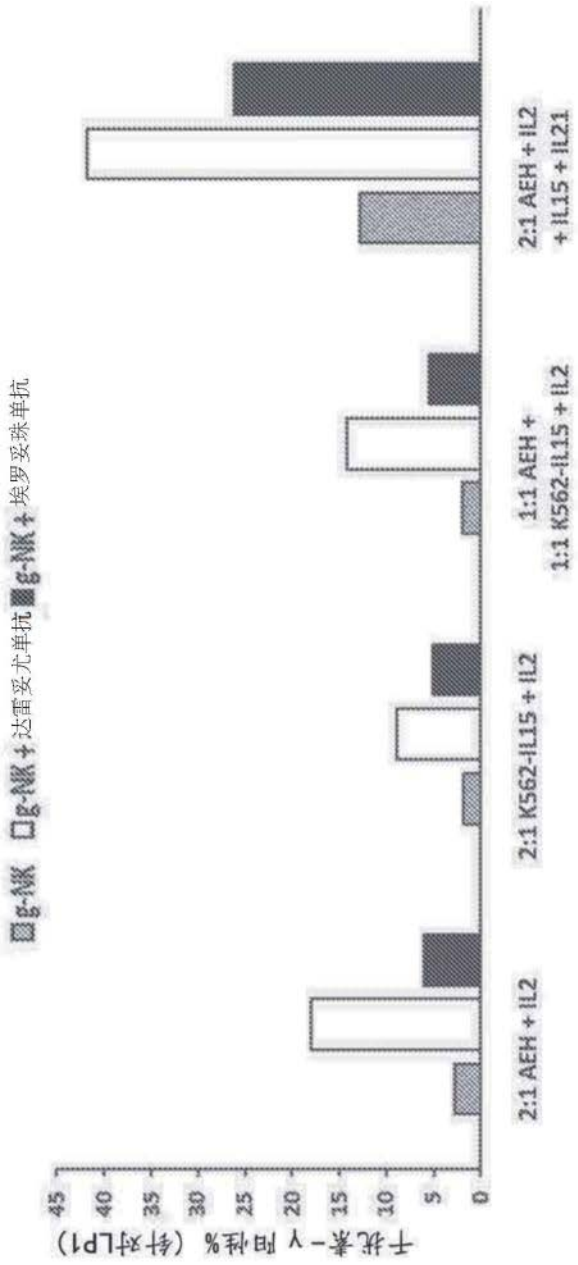


图5A

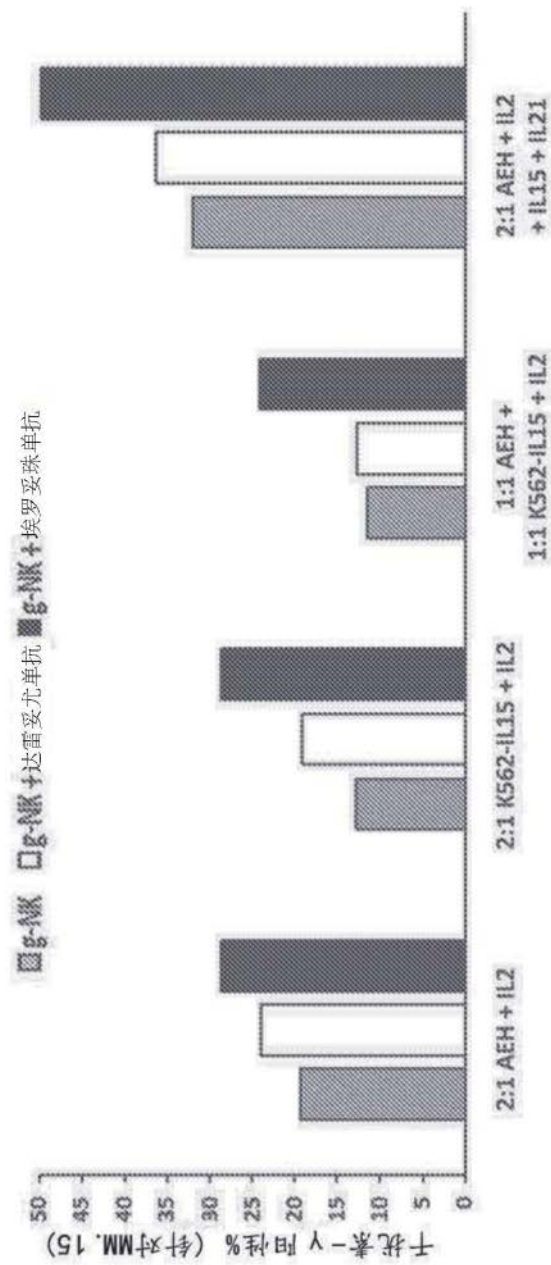


图5B

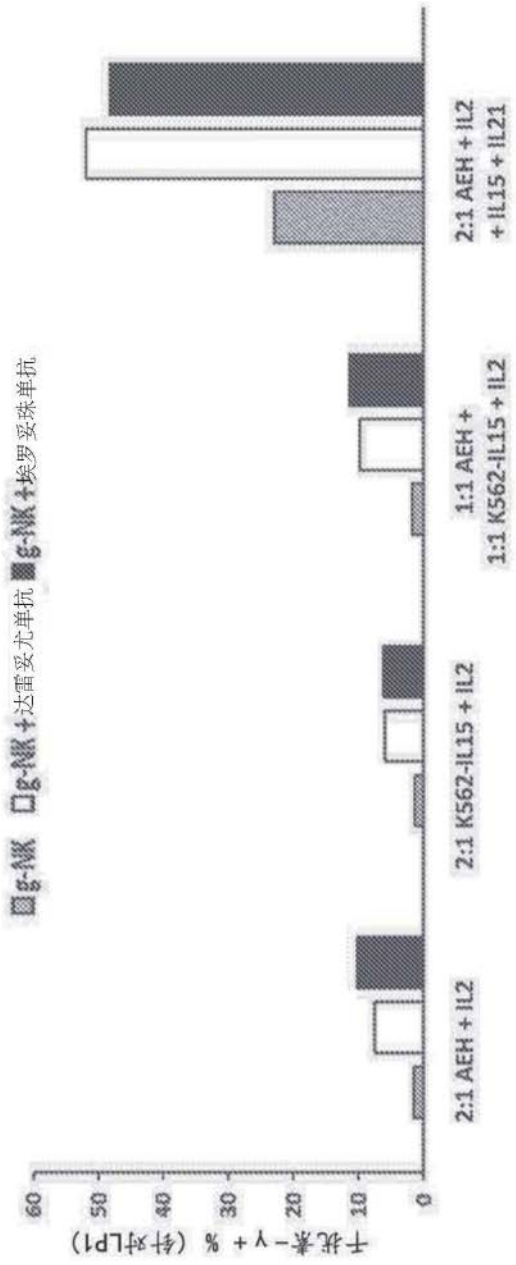


图5C

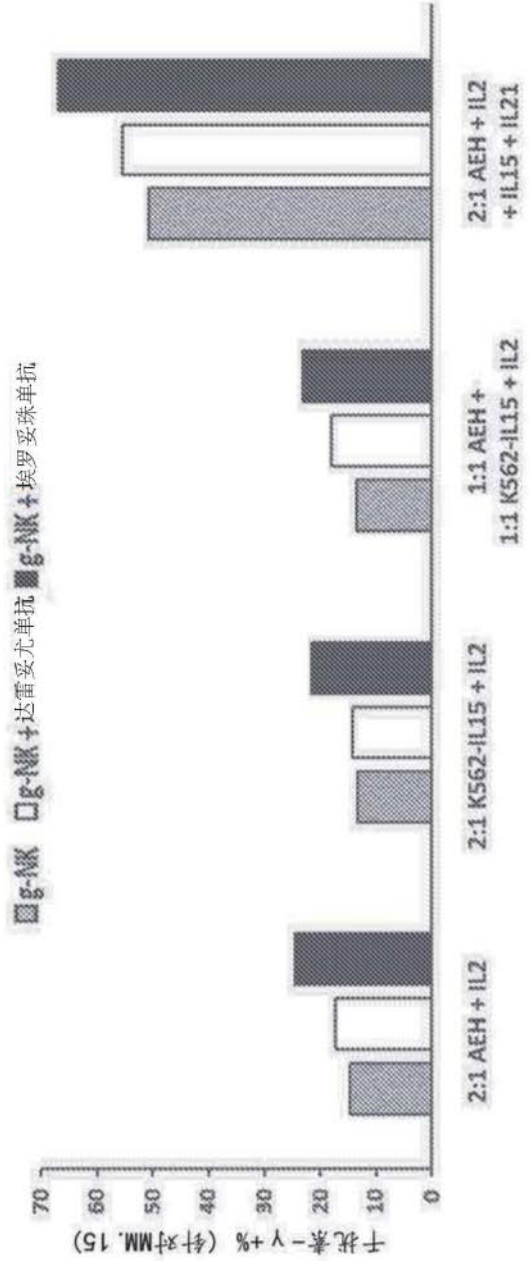


图5D

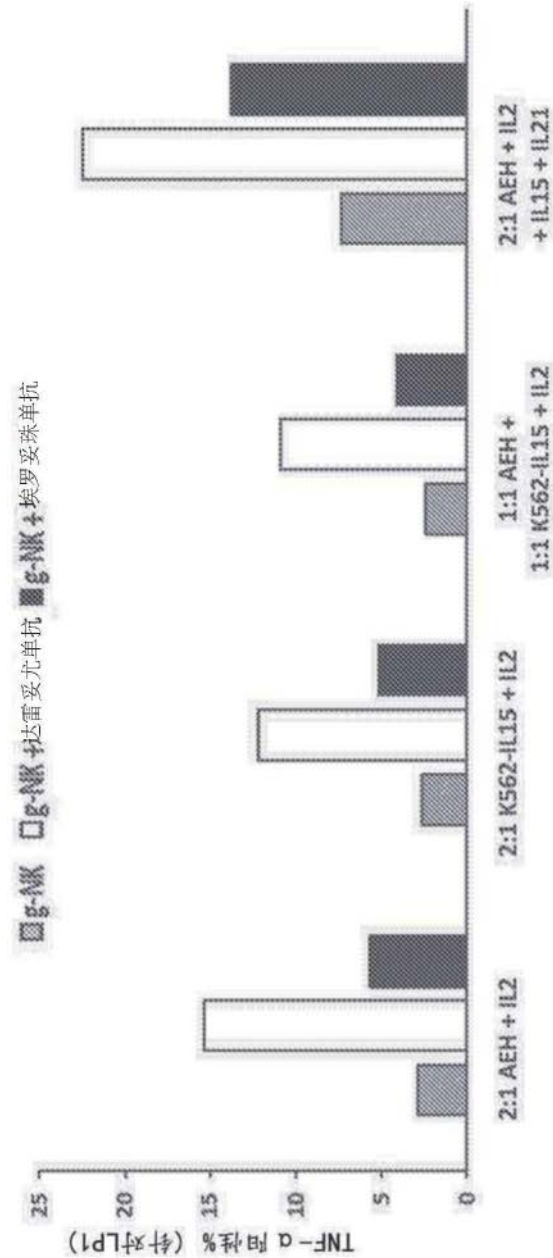


图6A

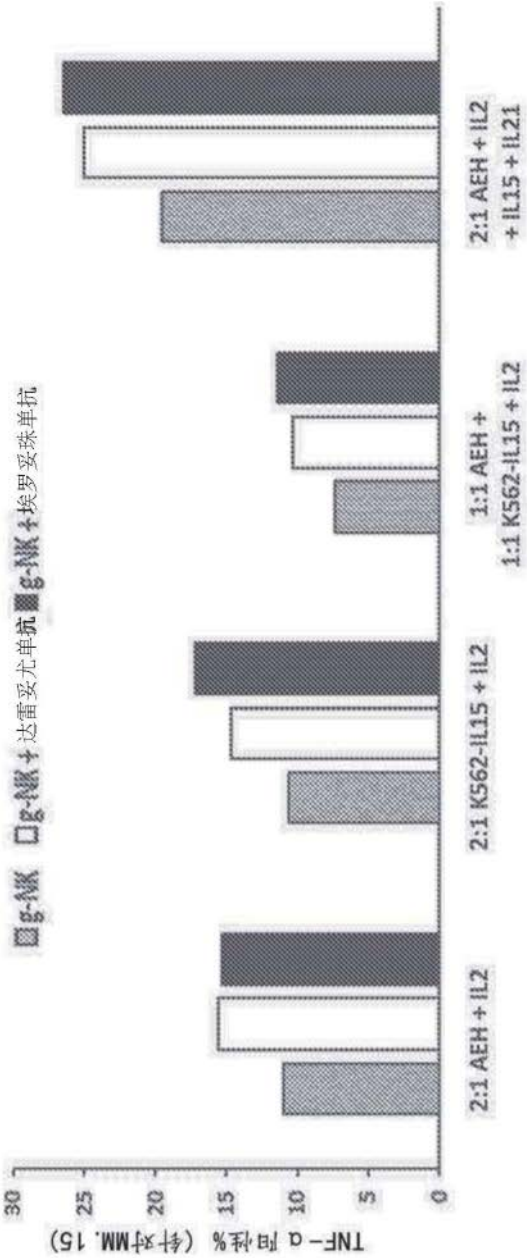


图6B

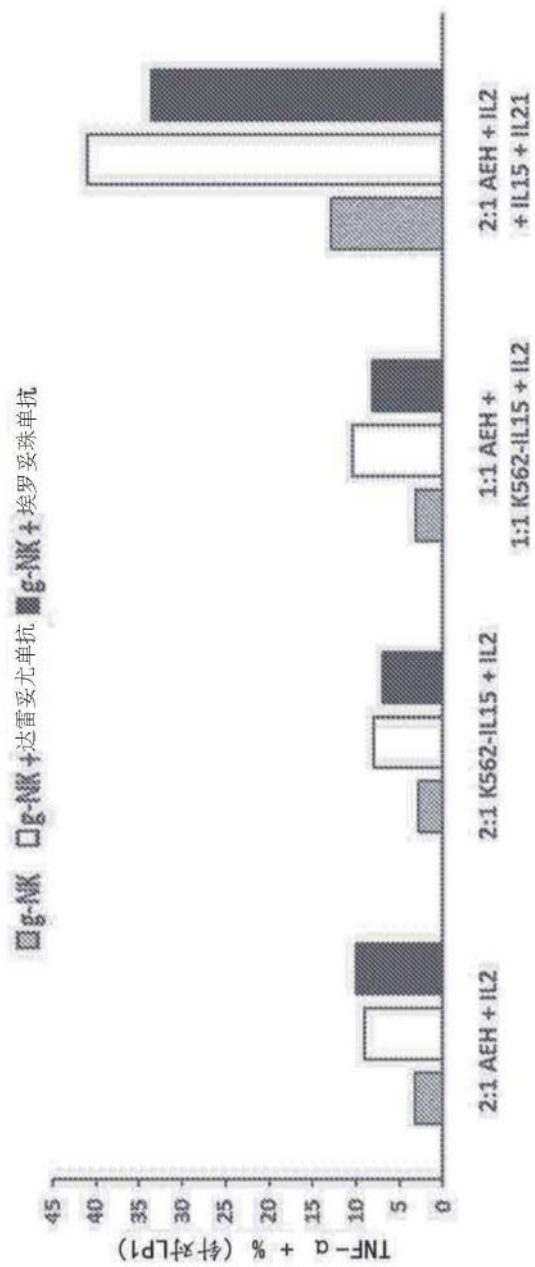


图6C

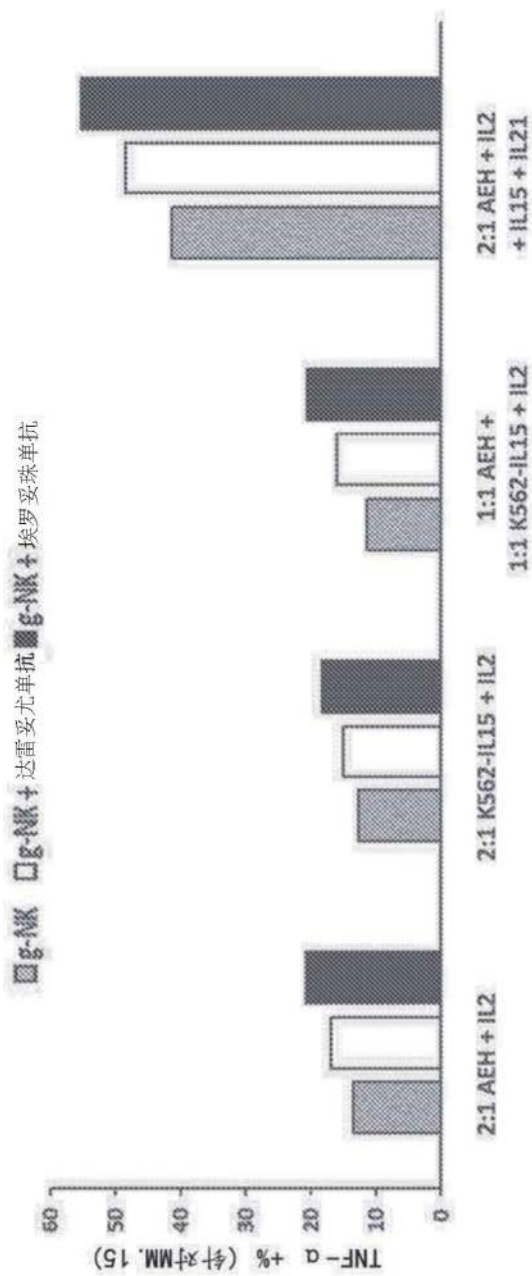


图6D

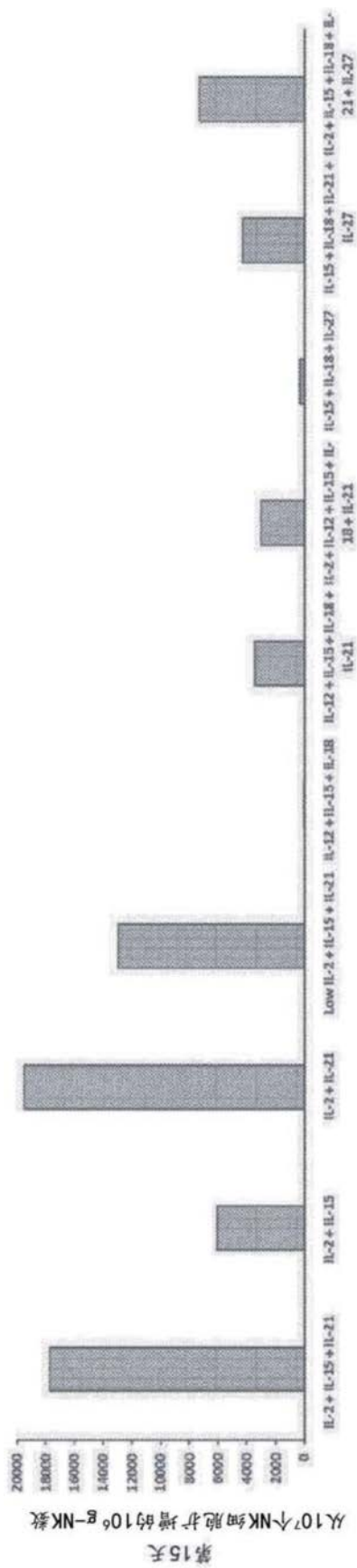


图7

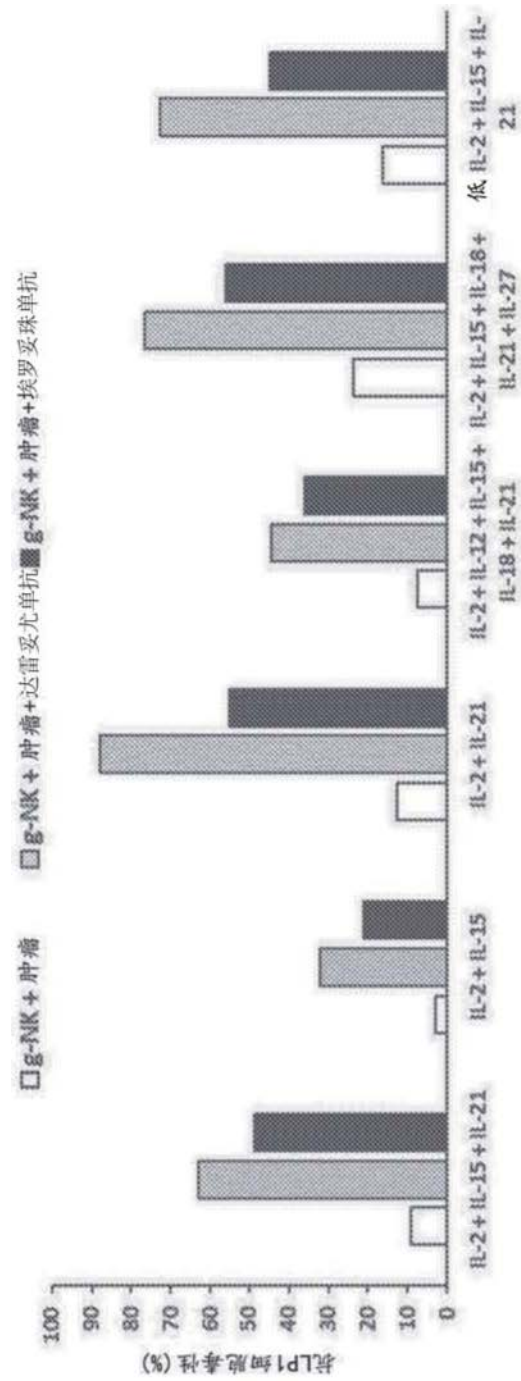


图8A

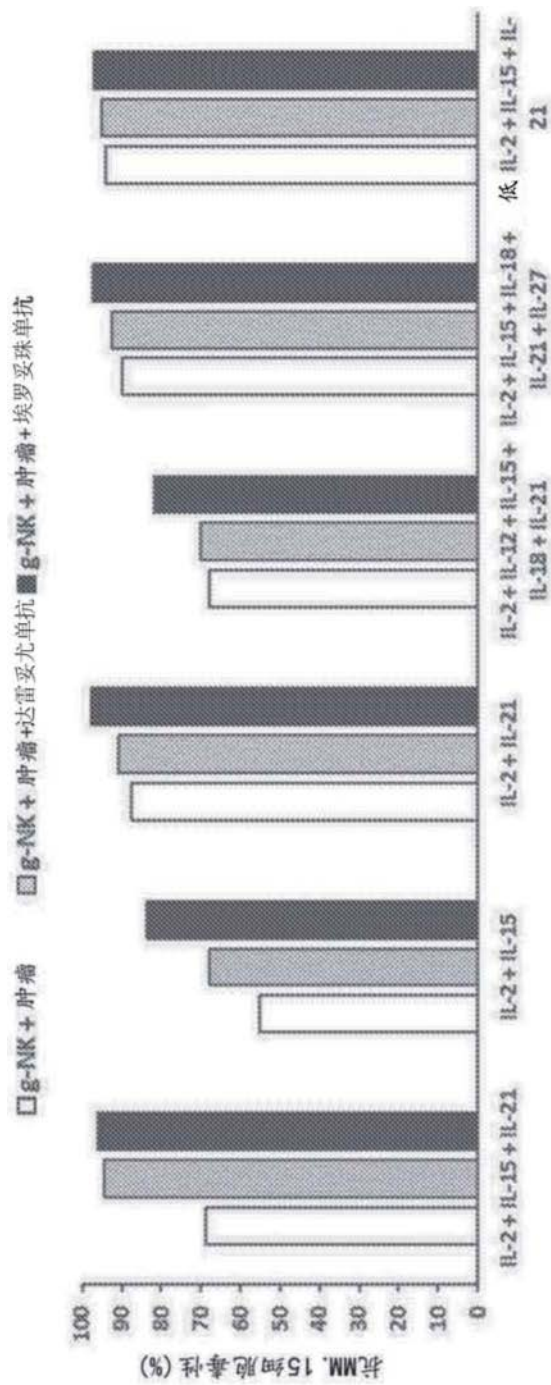


图8B

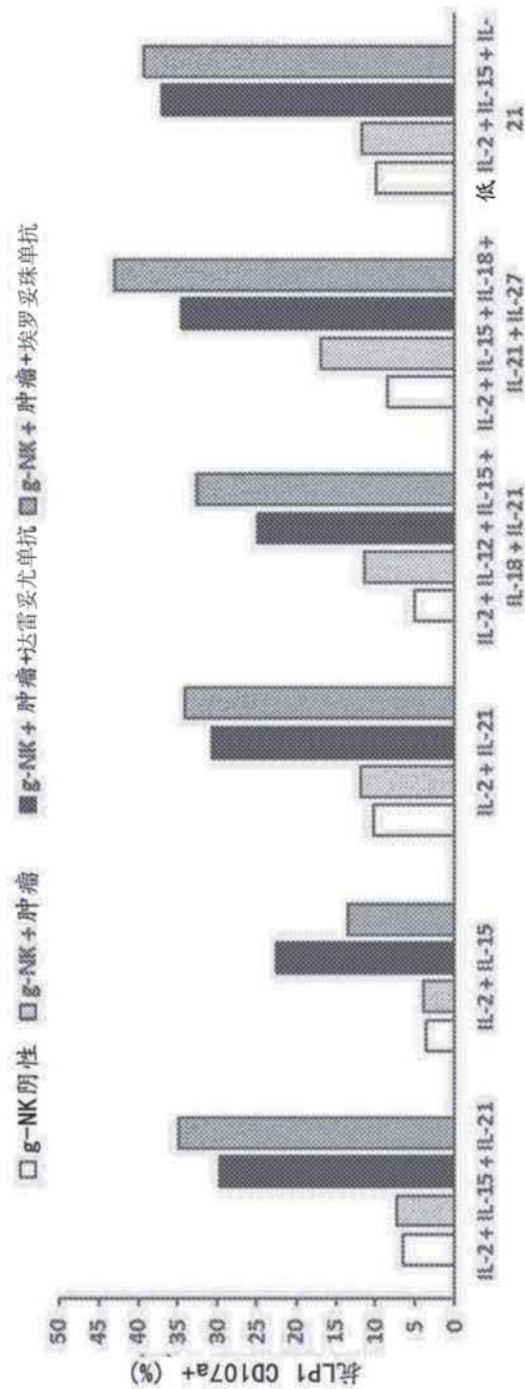


图8C

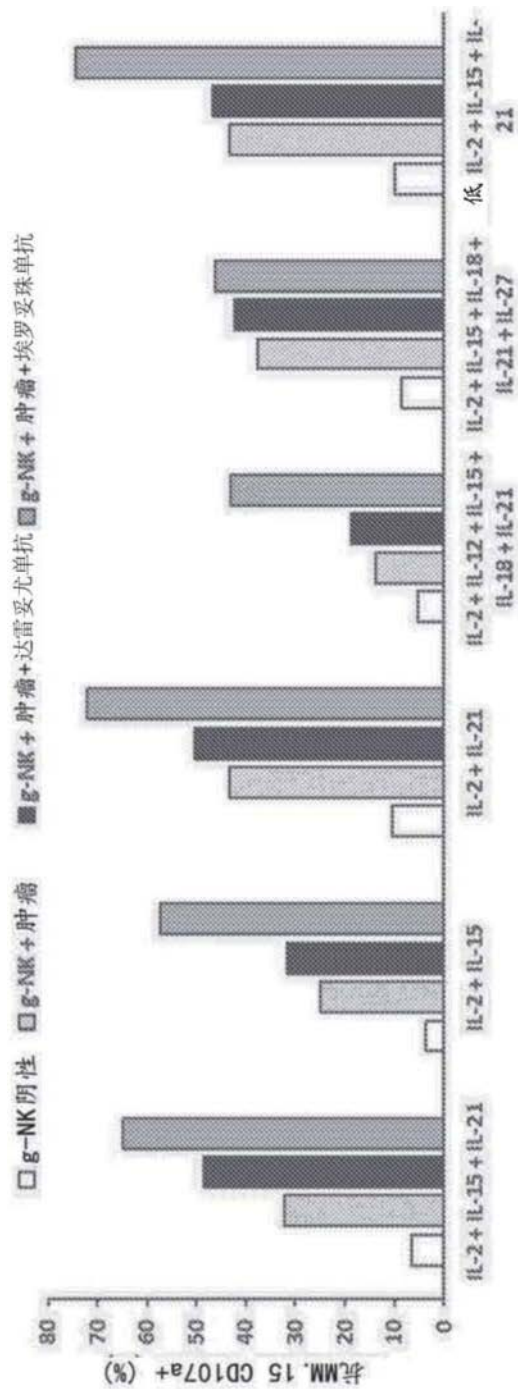


图8D

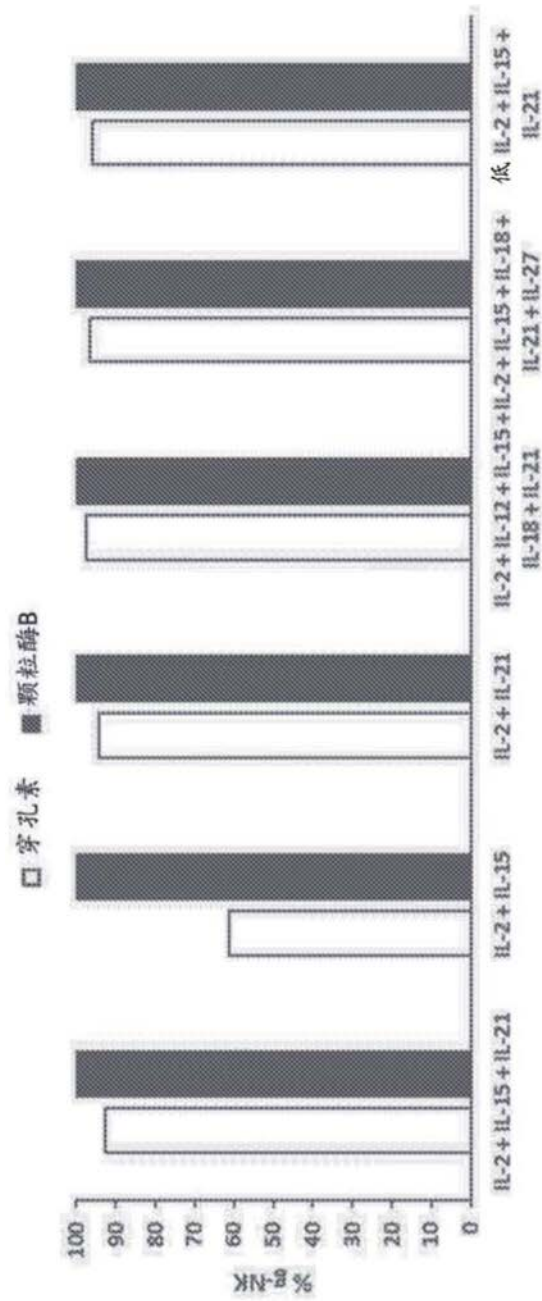


图8E

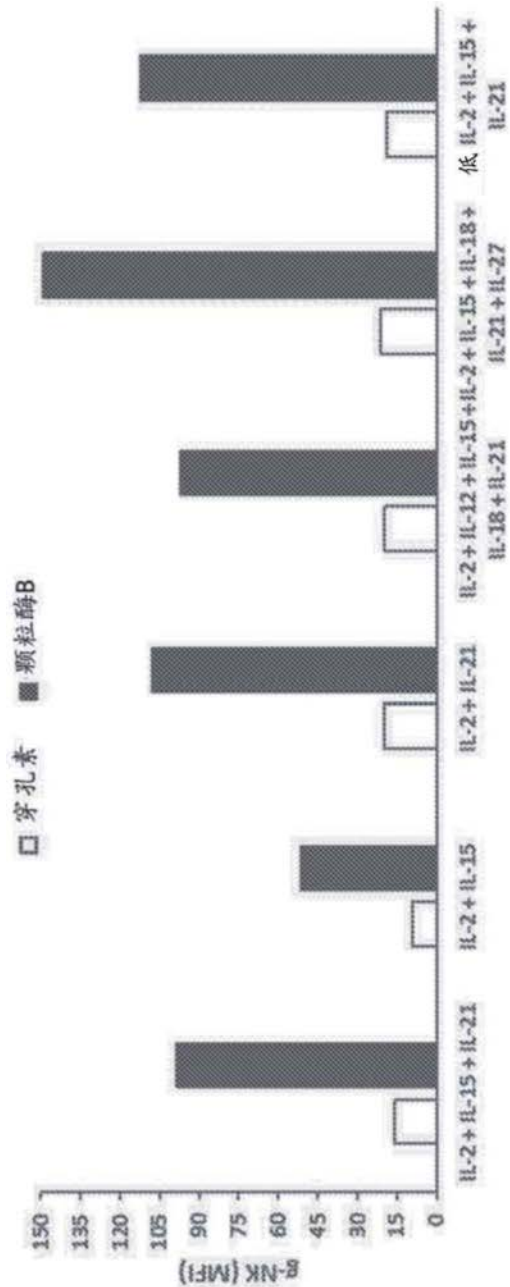


图8F

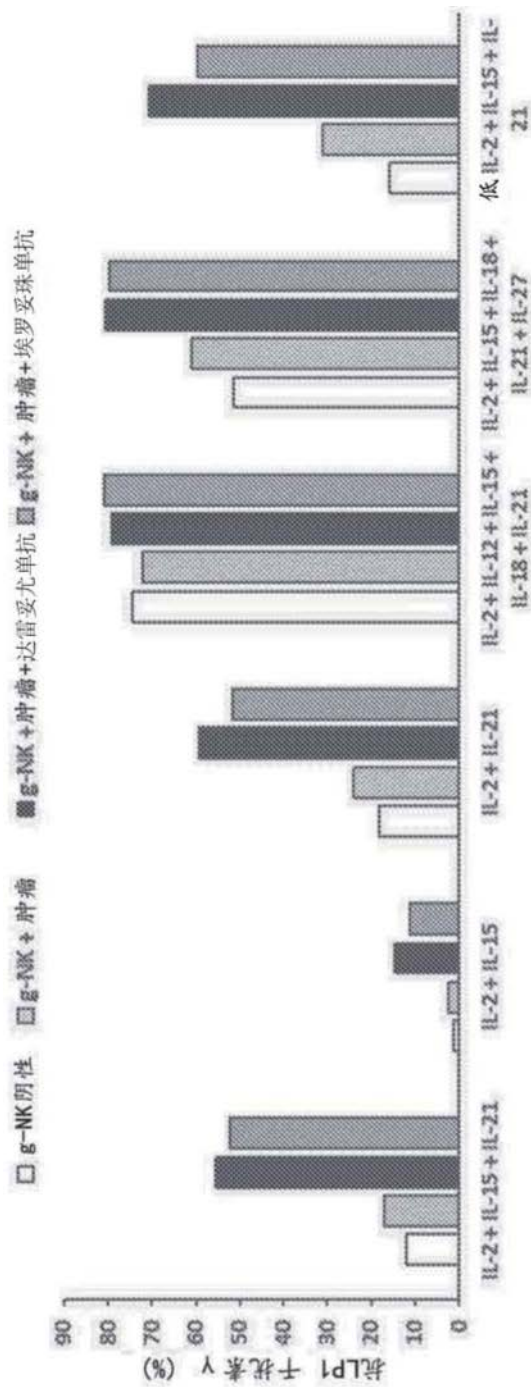


图8G

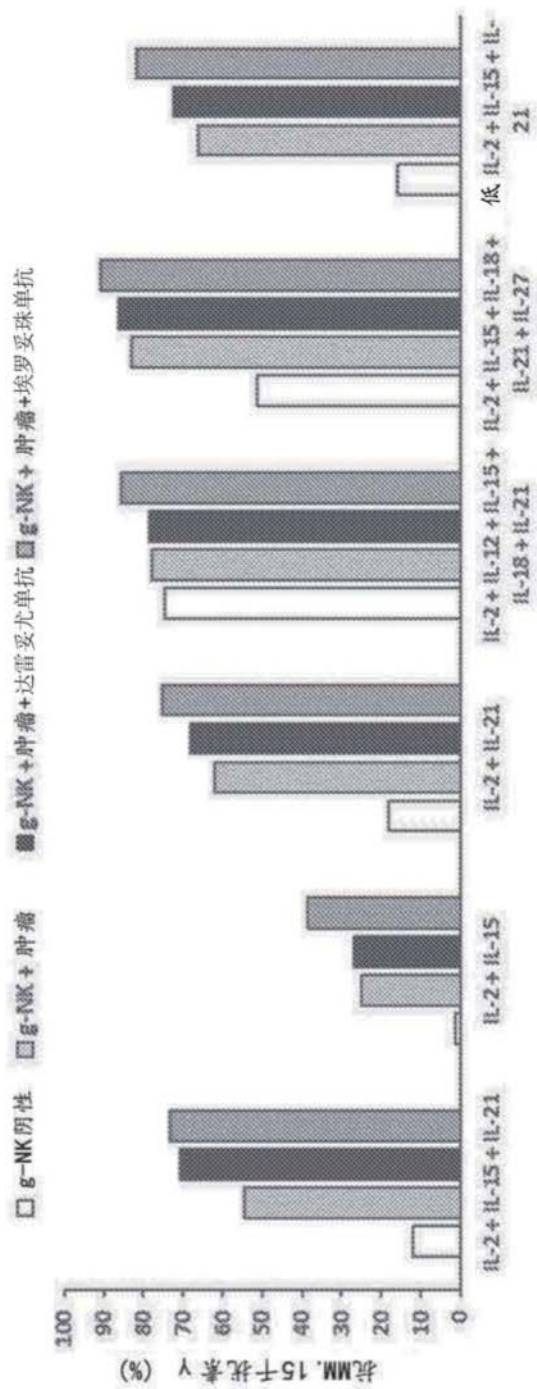


图8H

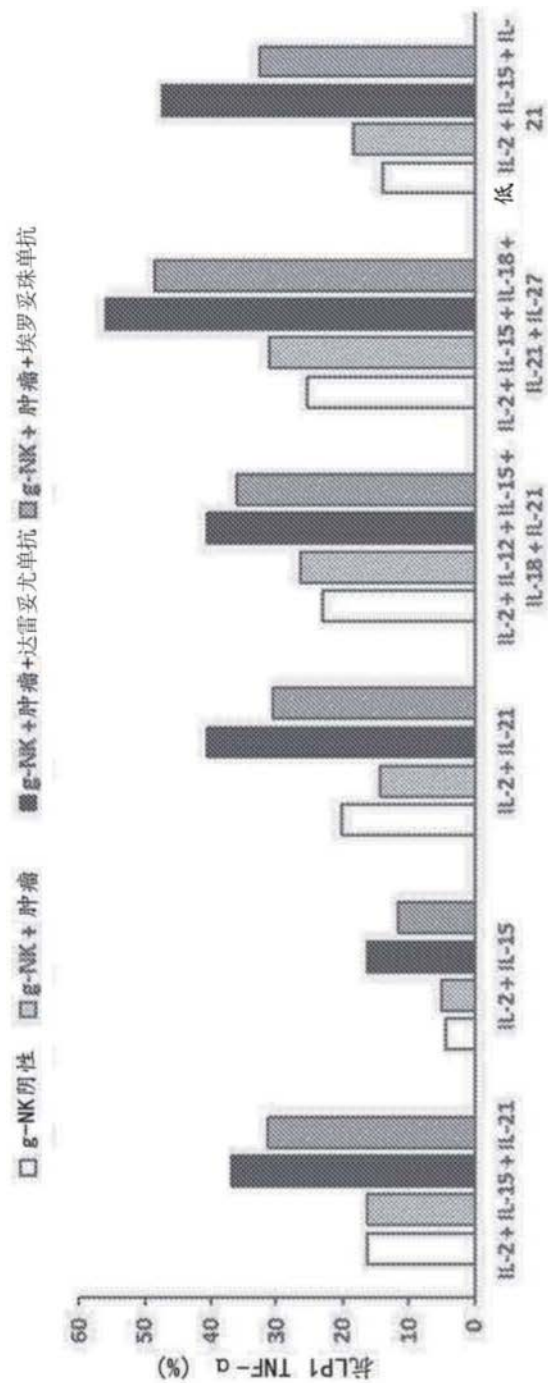


图8I

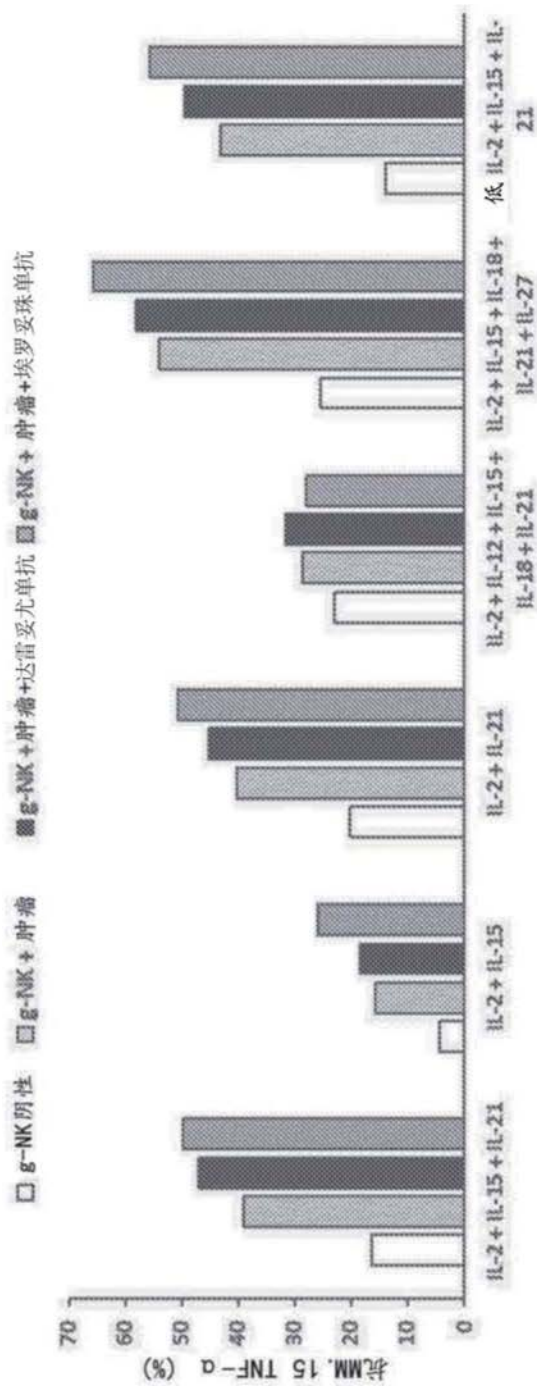


图8J

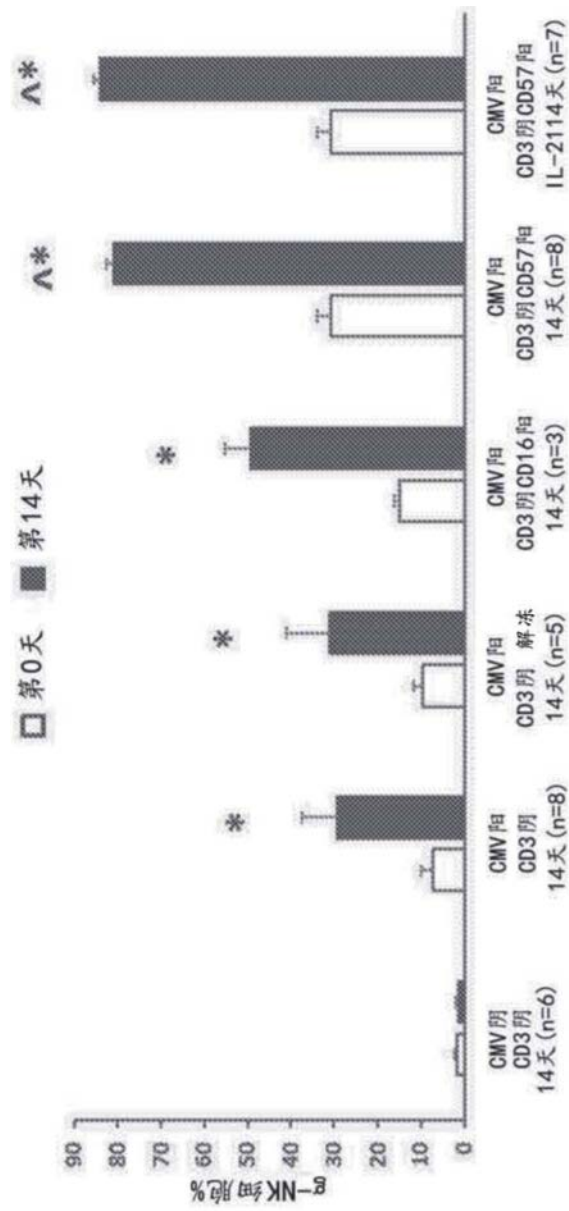


图9A

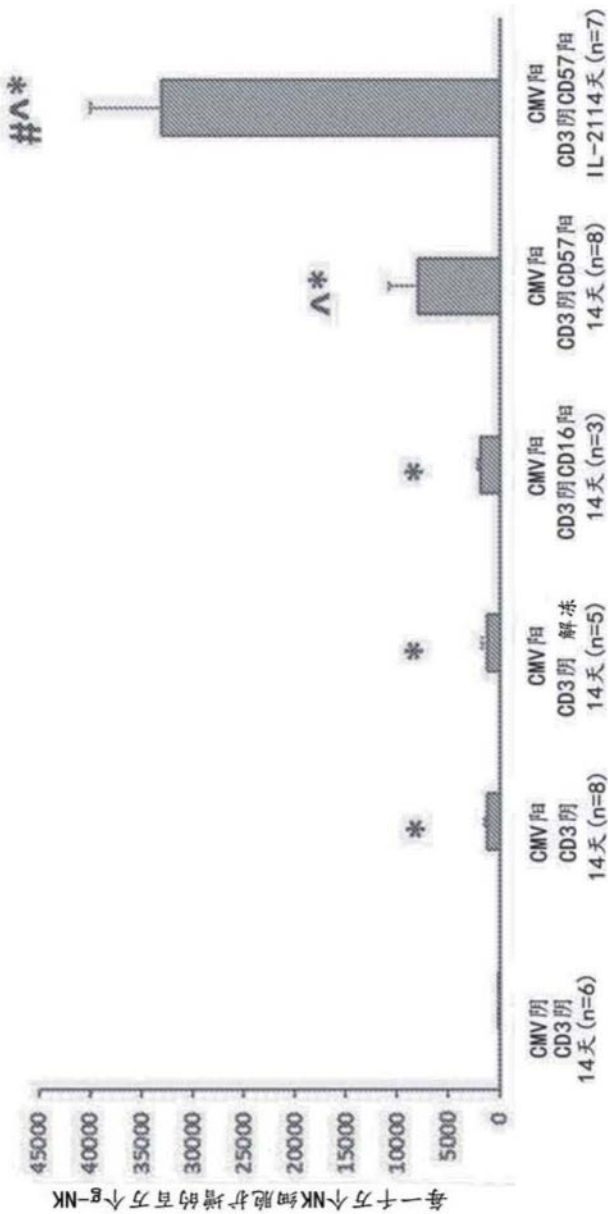


图9B

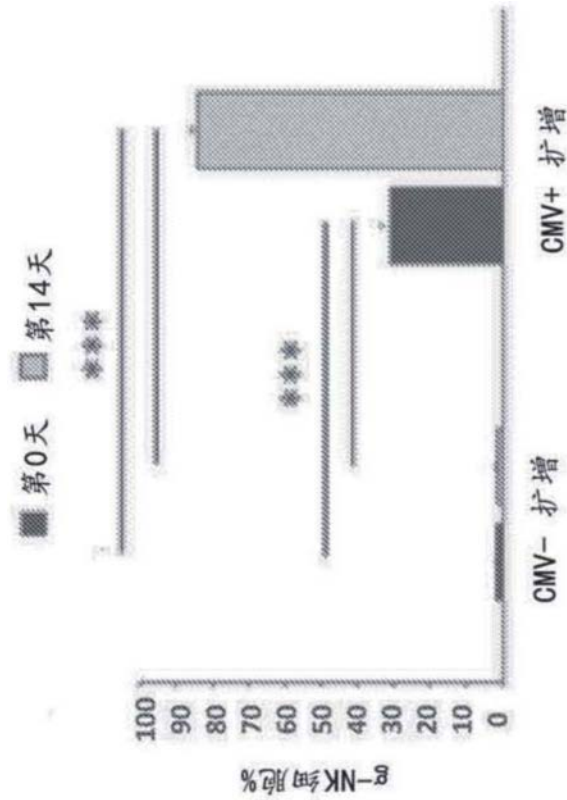


图9C

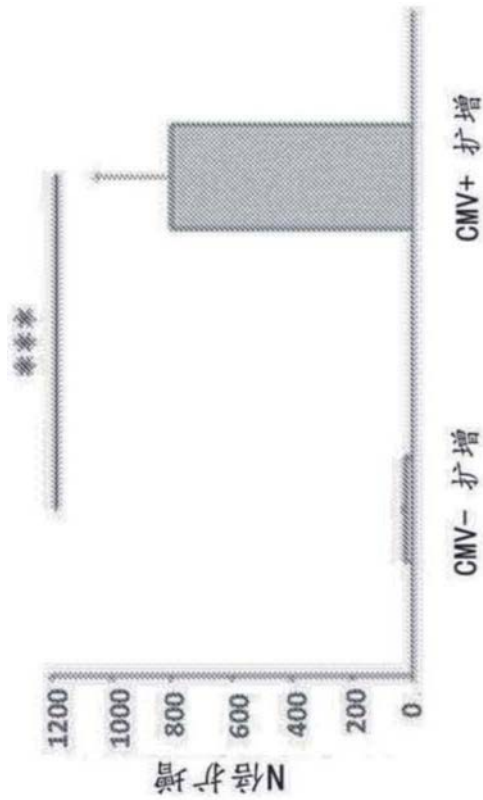


图9D

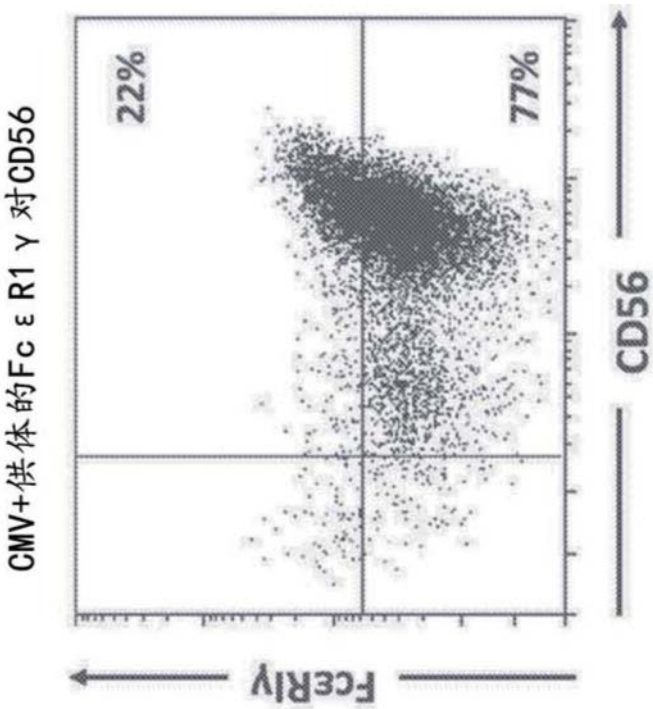


图9E

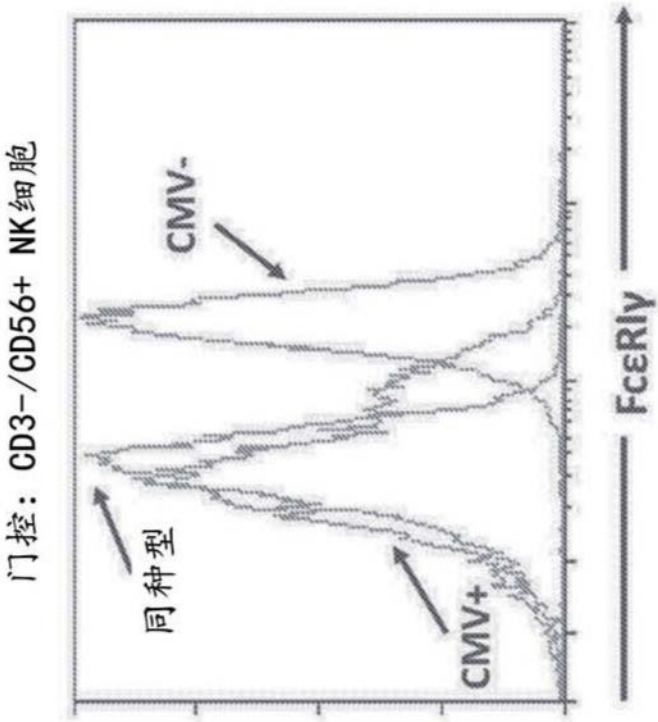


图9F

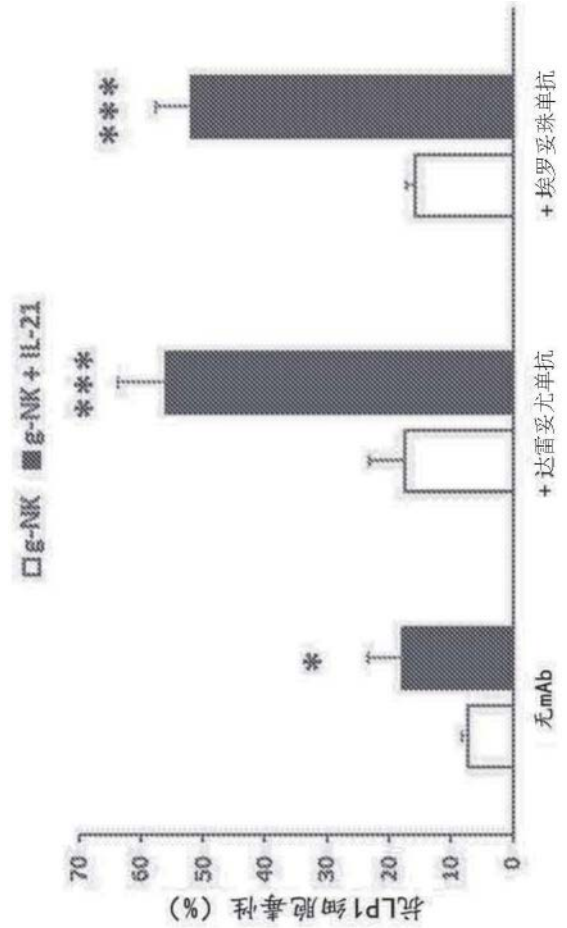


图9G

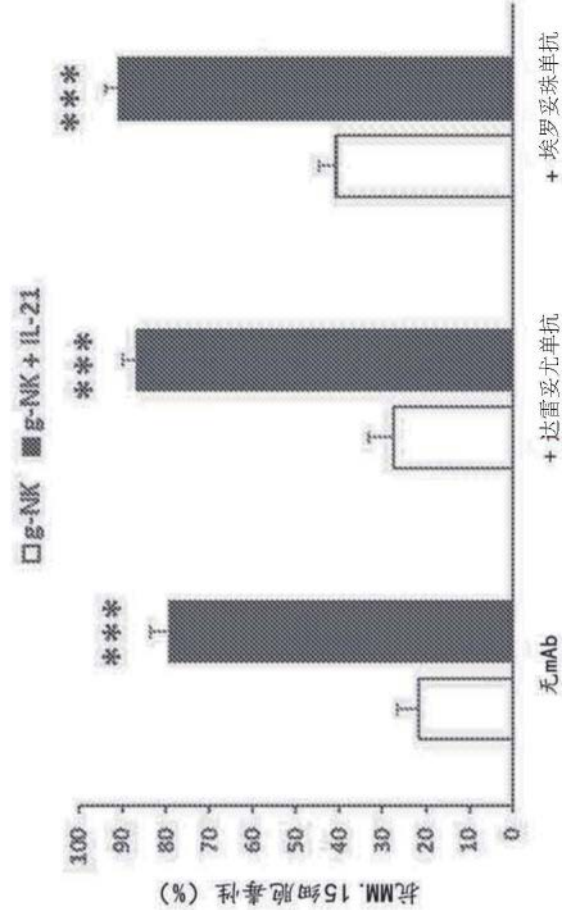


图9H

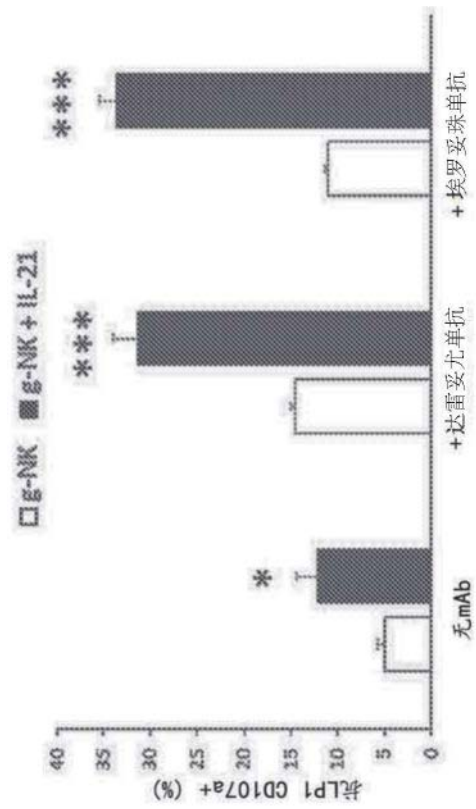


图9I

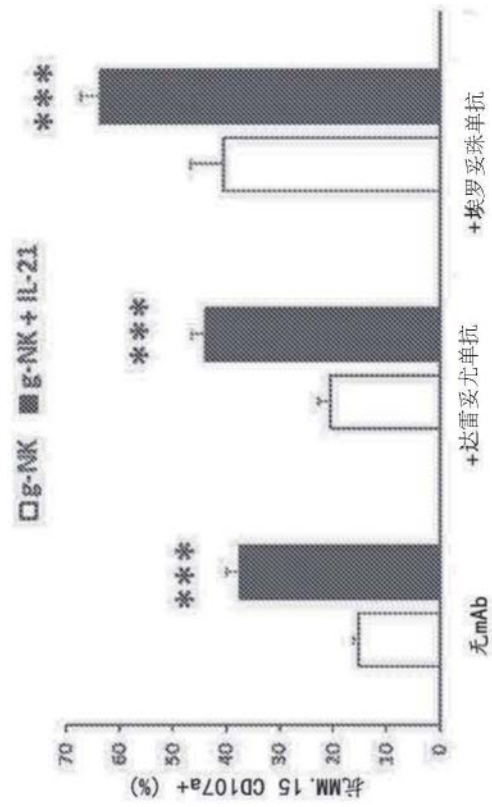


图9J

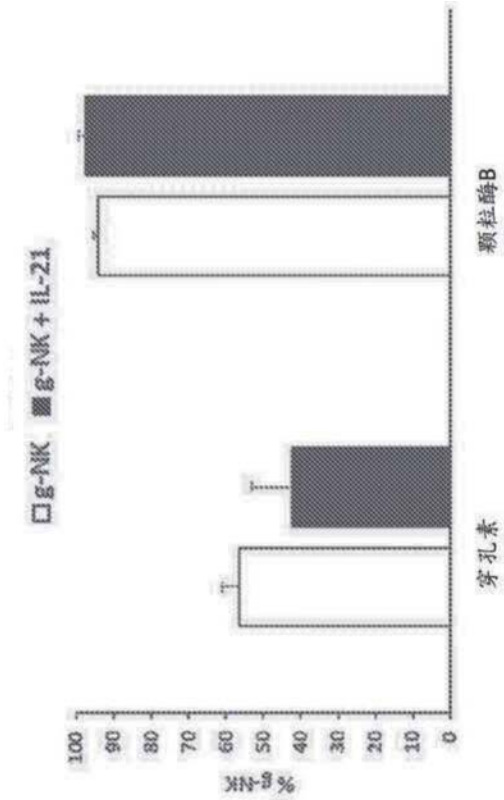


图9K

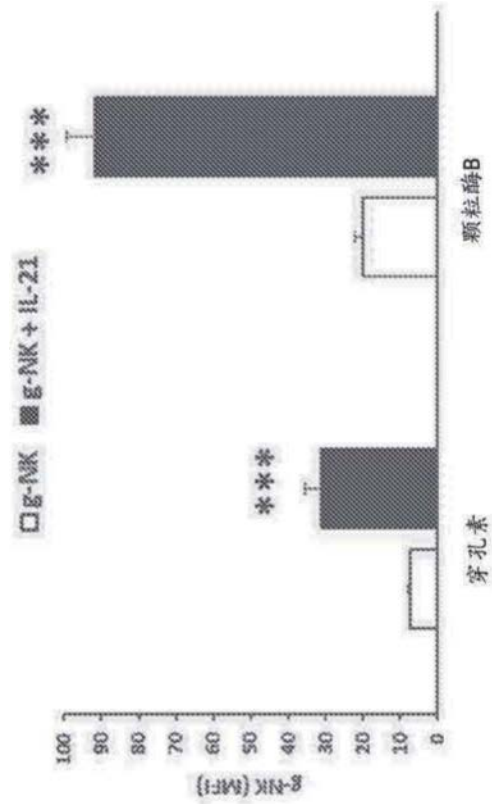


图9L



图9M

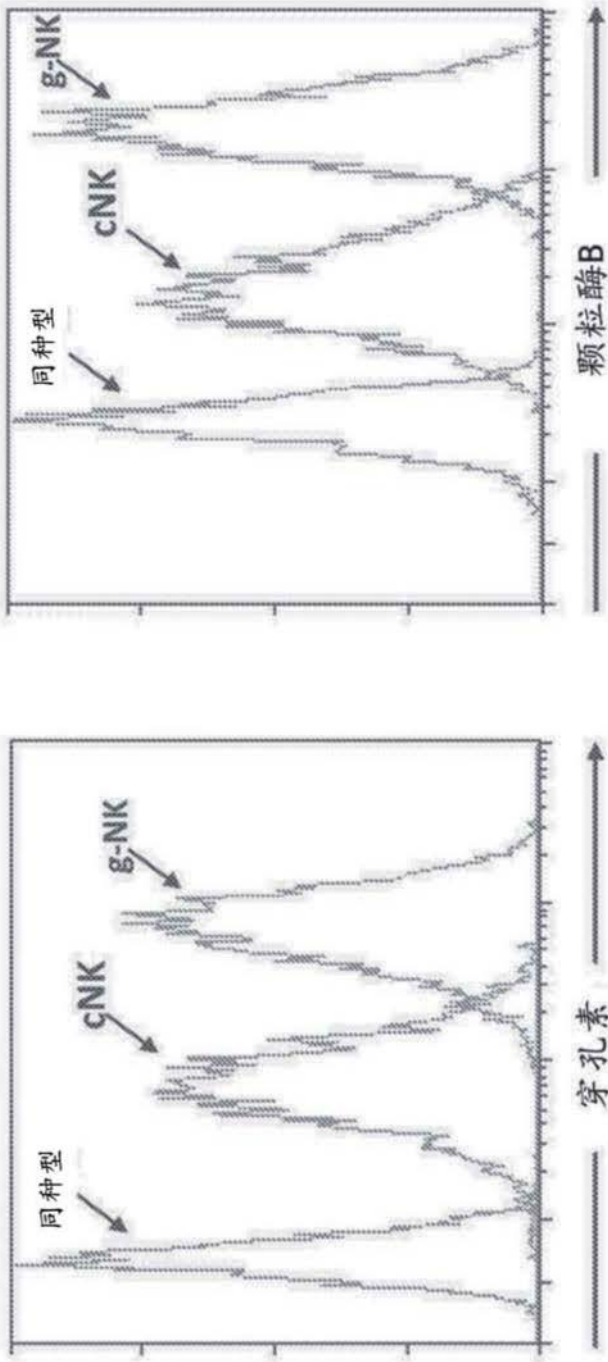


图9N

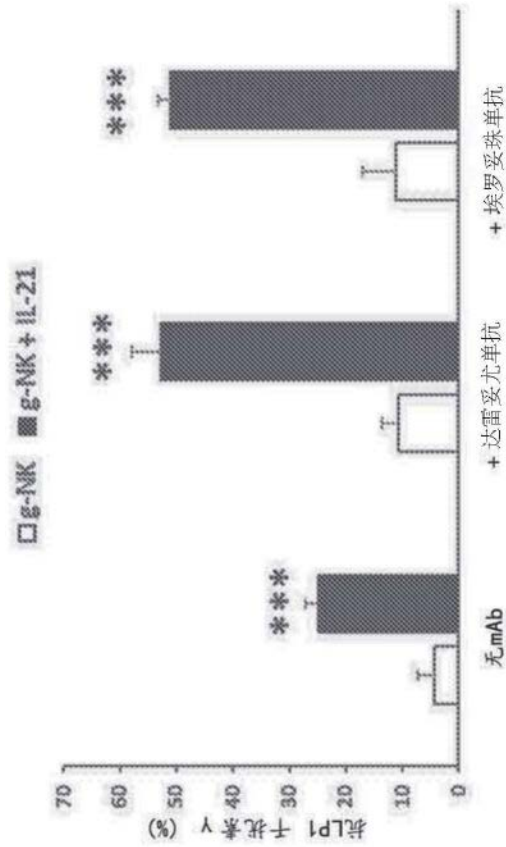


图90

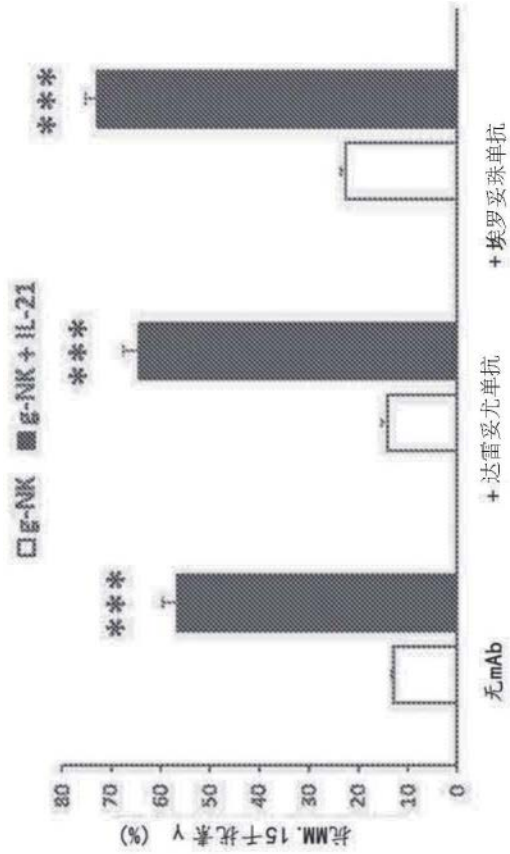


图9P

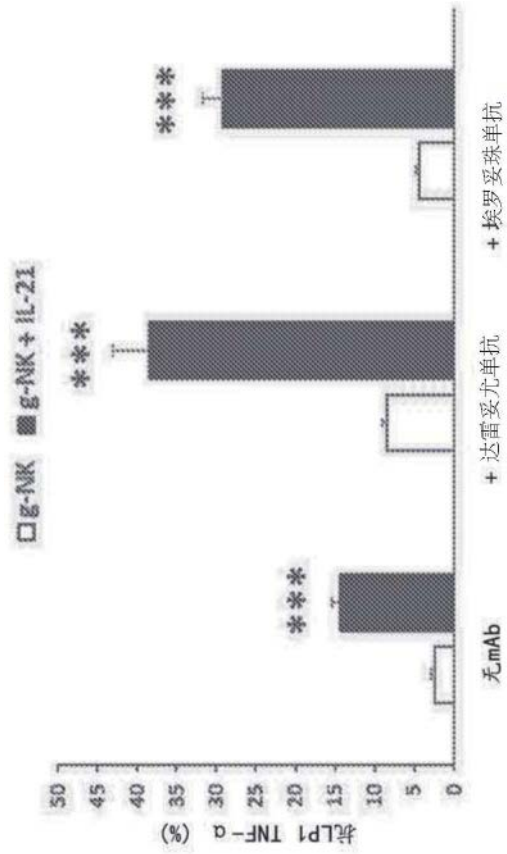


图9Q

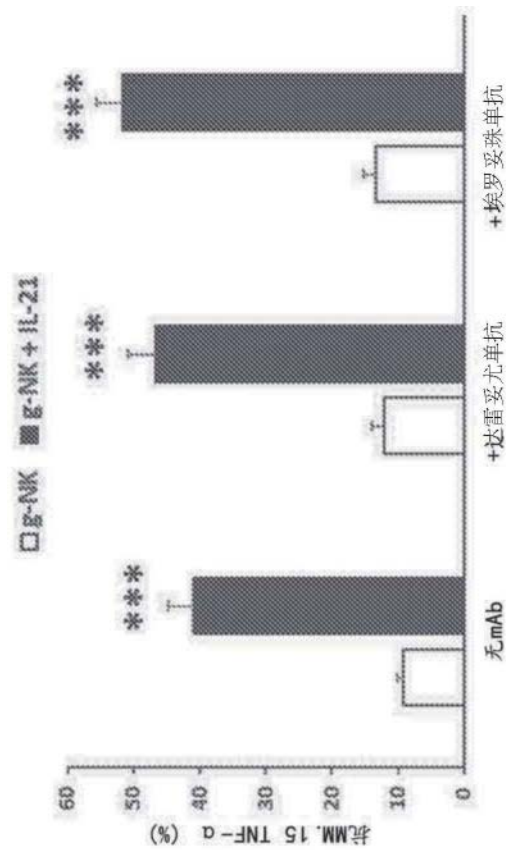


图9R

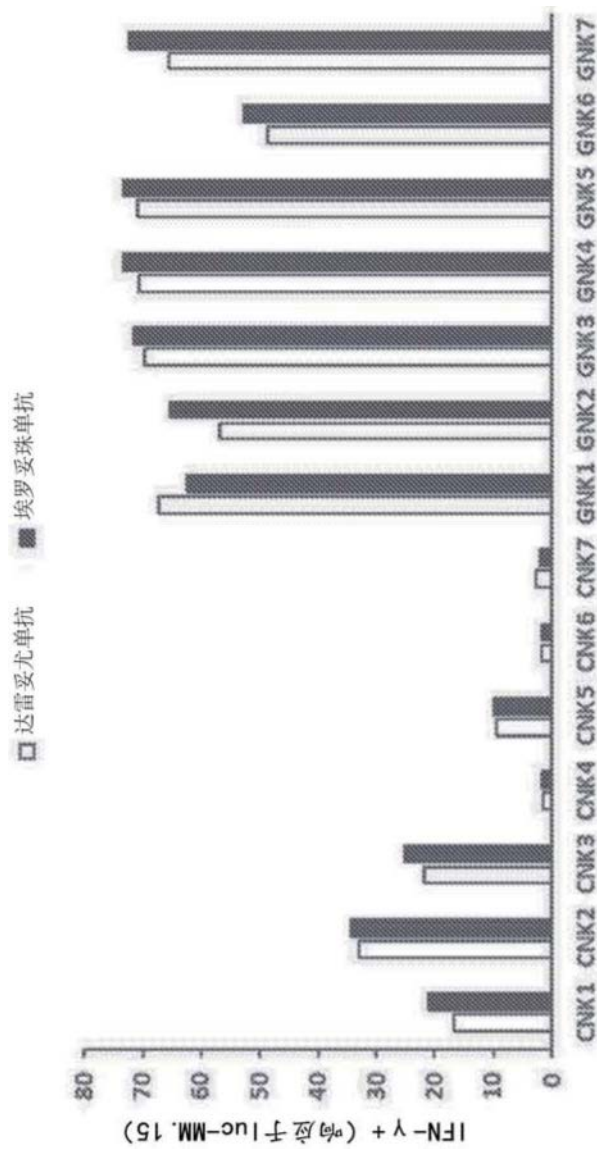


图9S

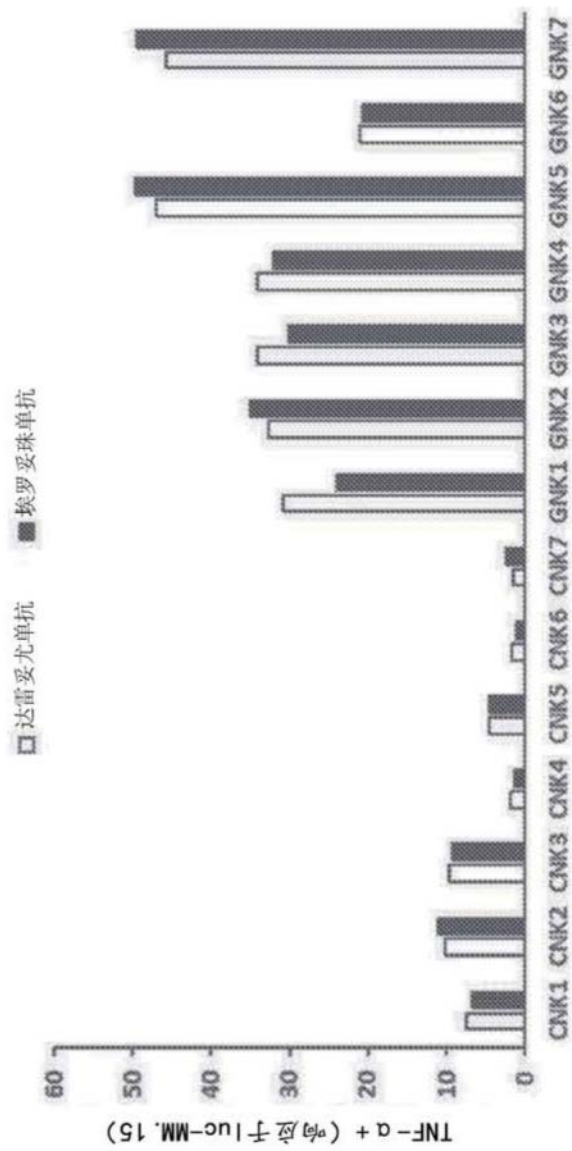


图9T

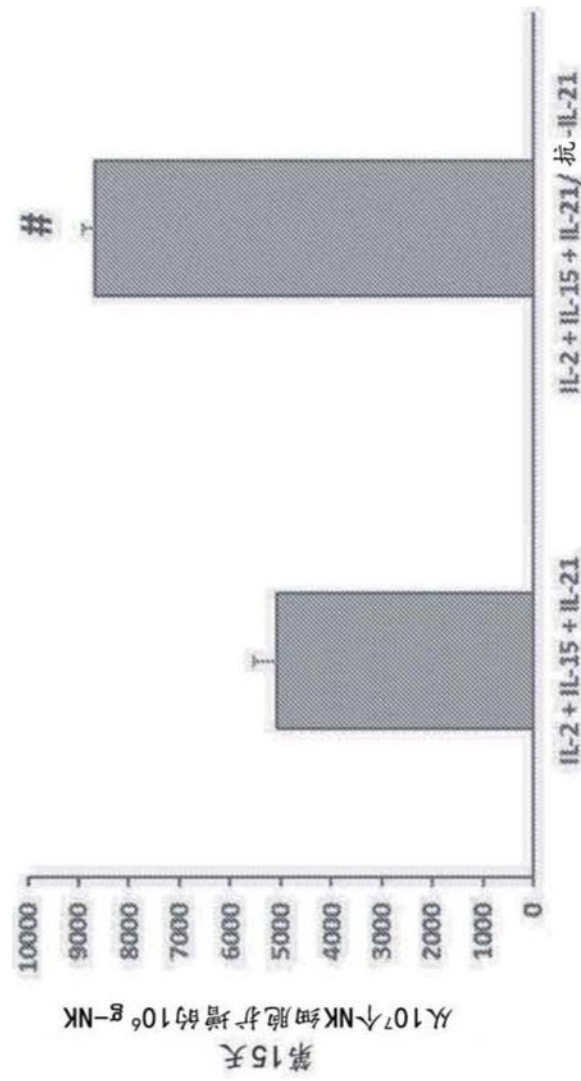


图10

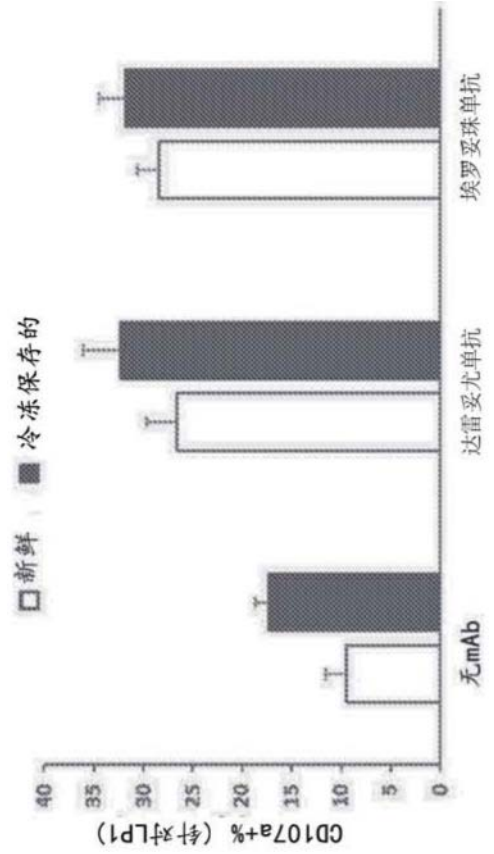


图11A

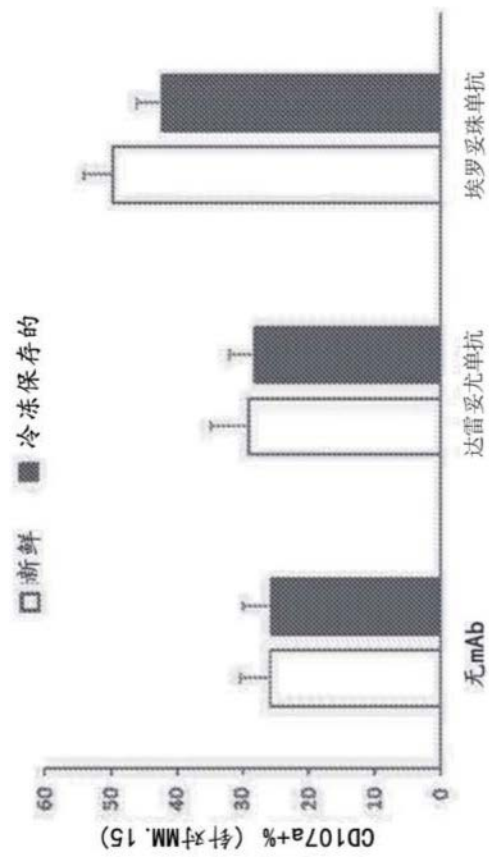


图11B

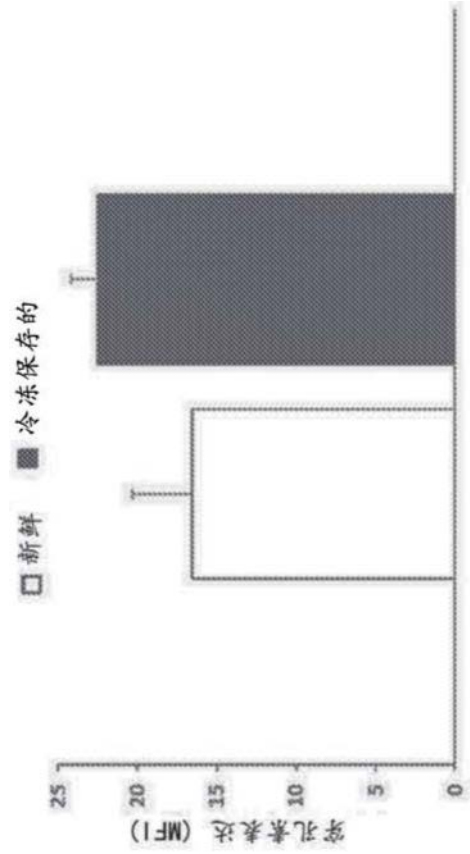


图11C

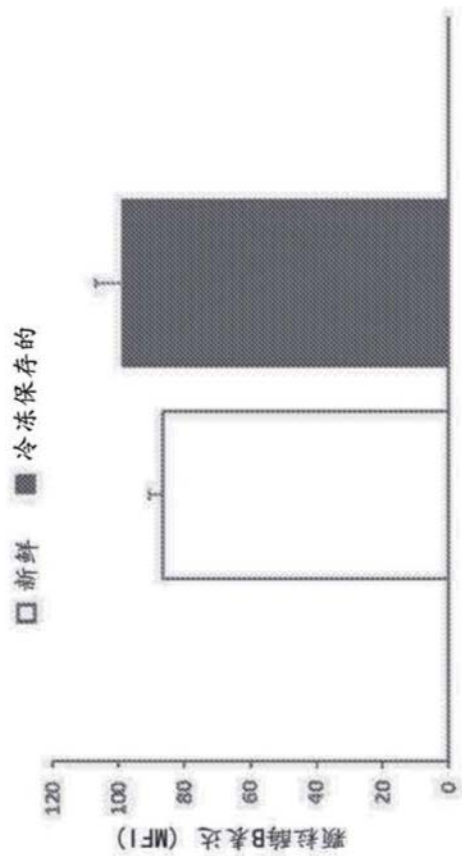


图11D

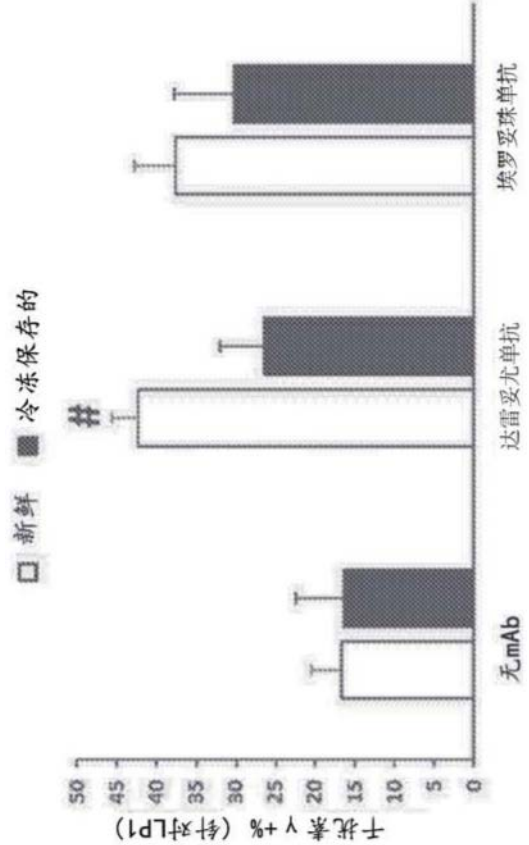


图11E

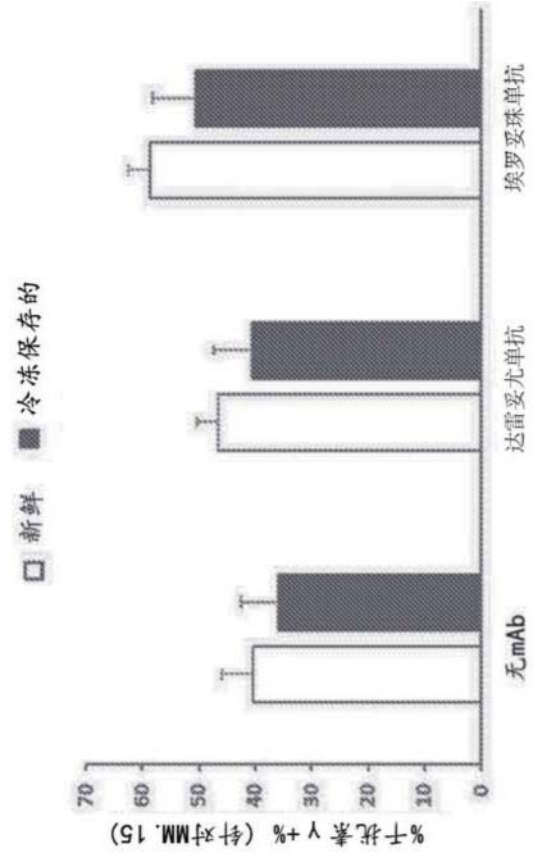


图11F

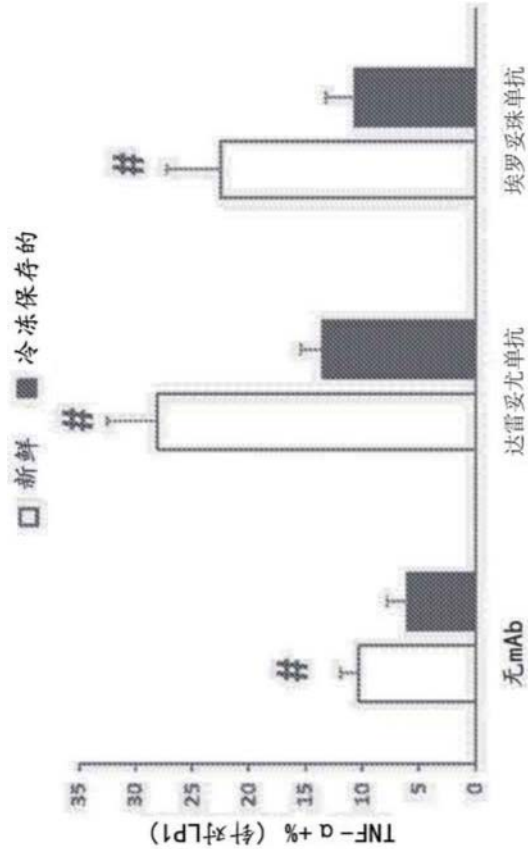


图11G

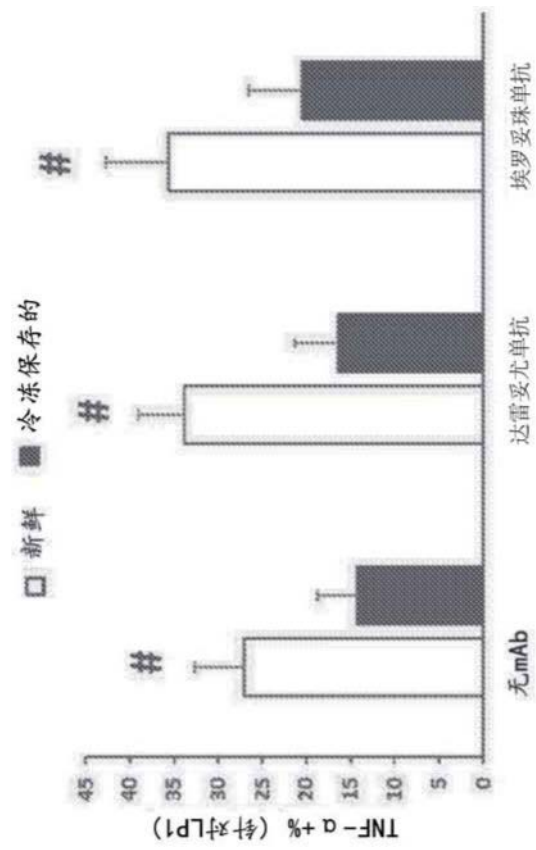


图11H

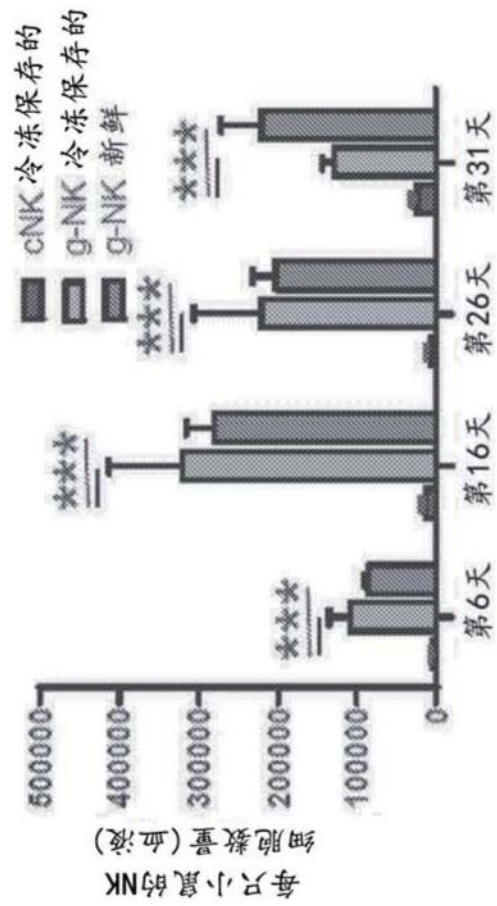


图12A

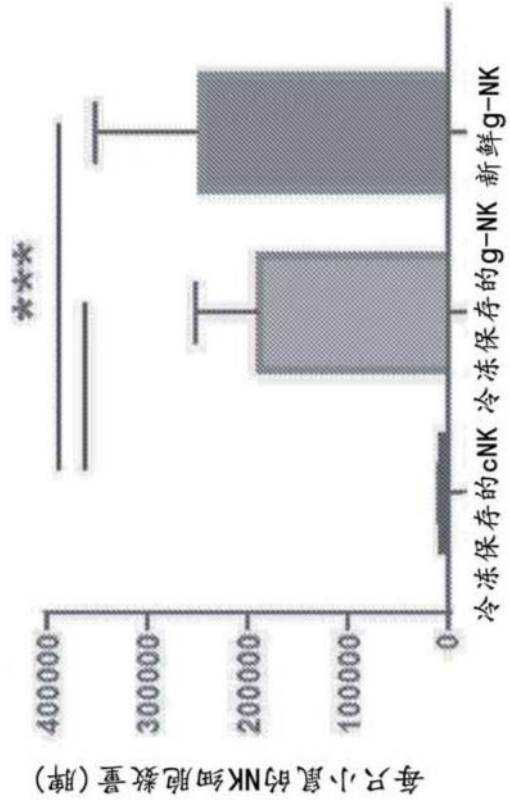


图12B

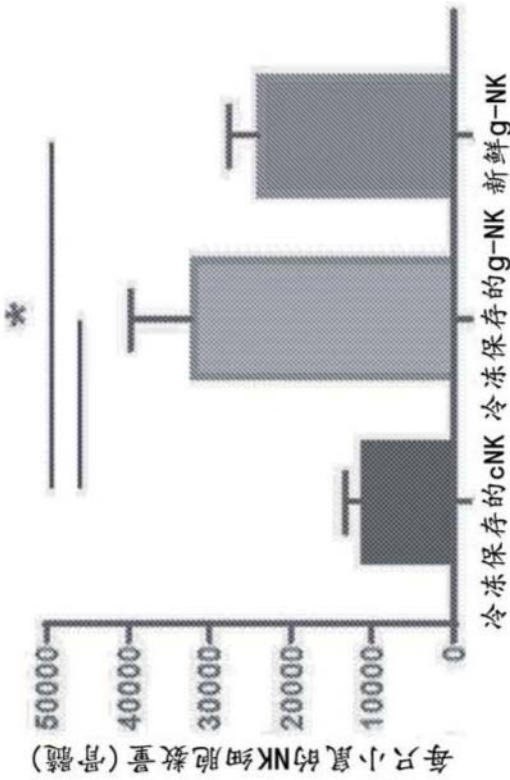


图12C

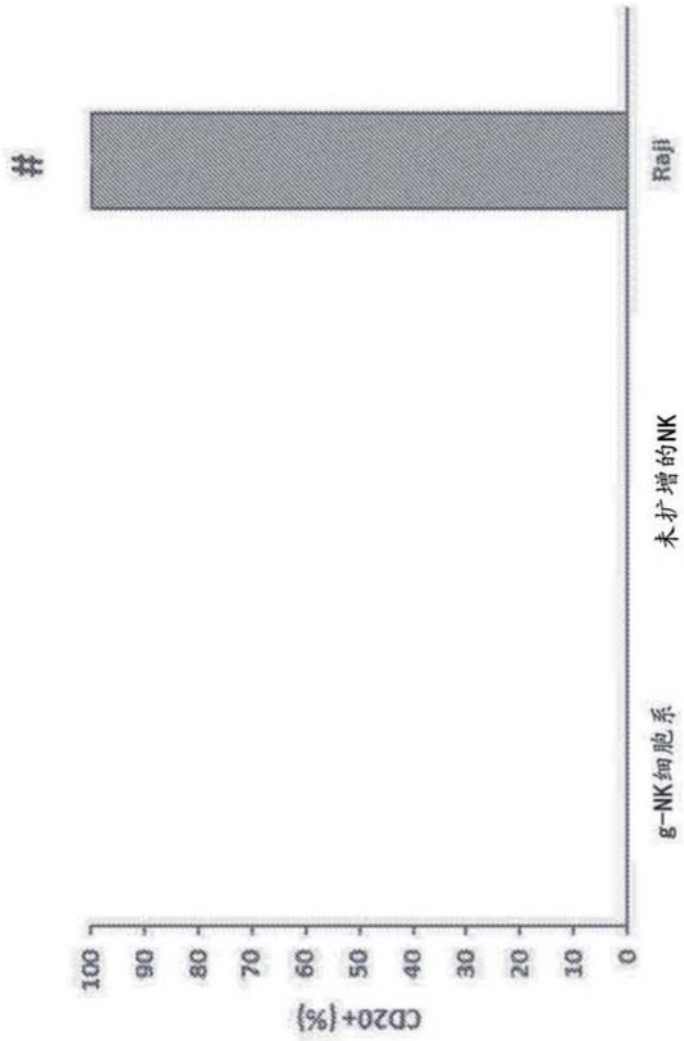


图13A

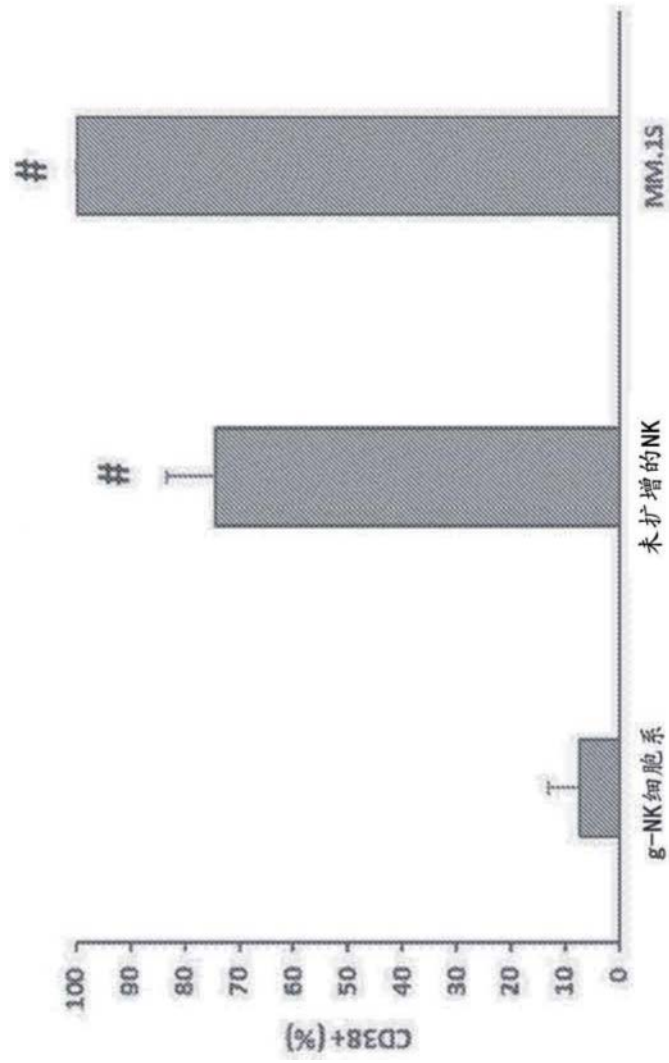


图13B

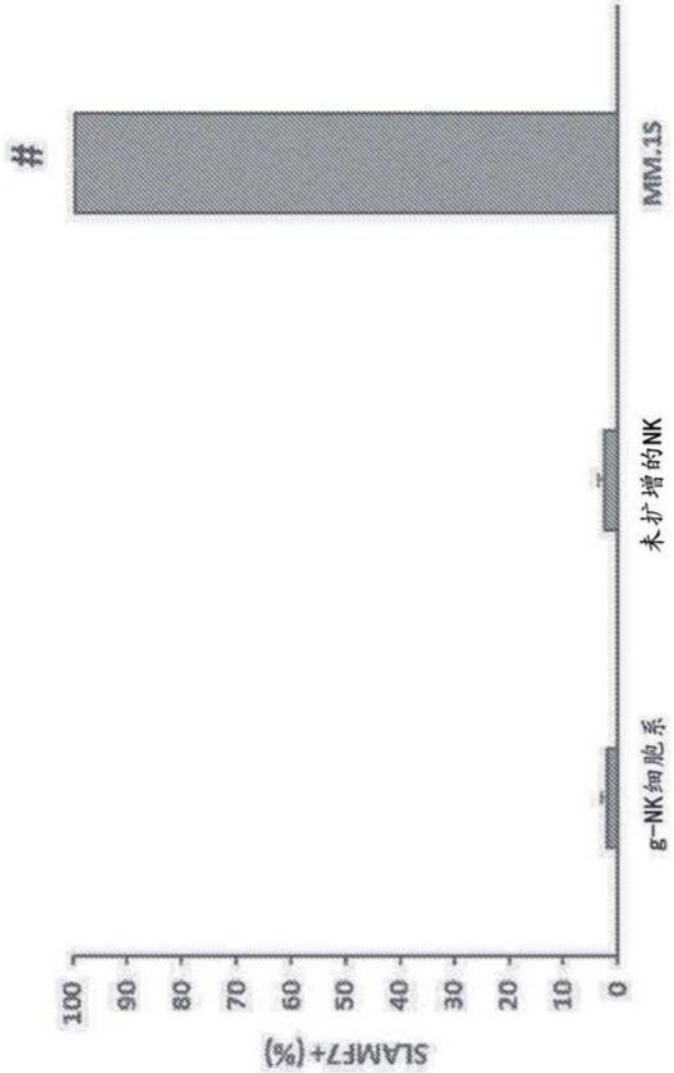


图13C

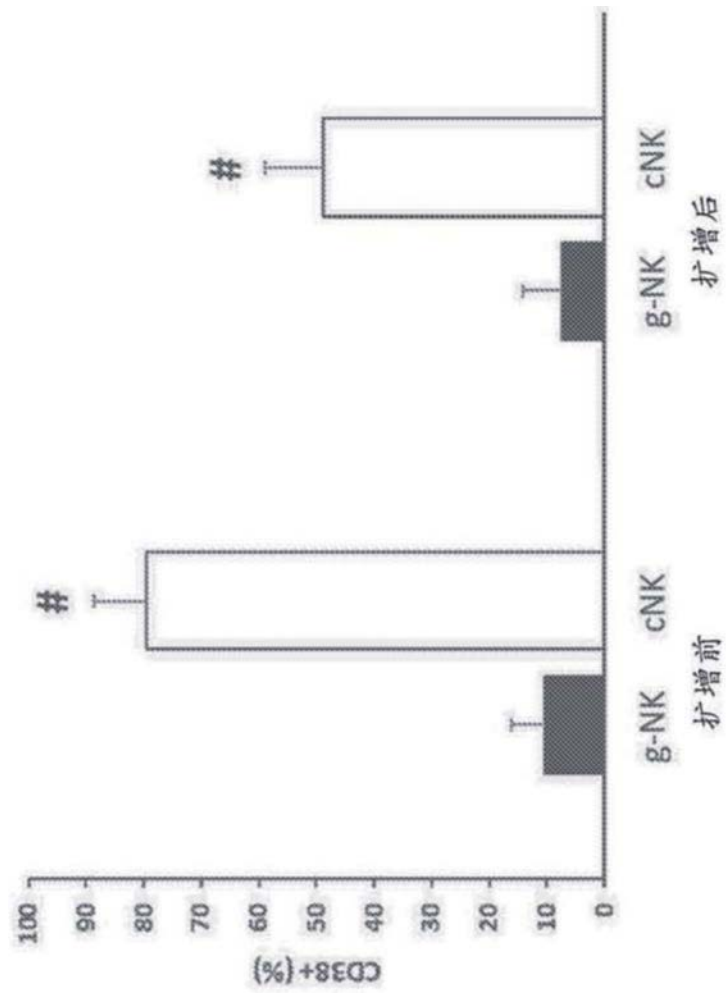


图13D

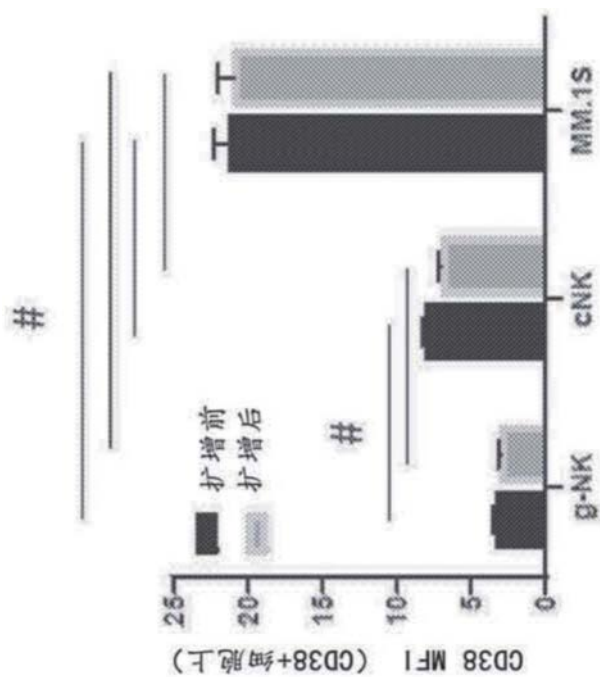


图13E

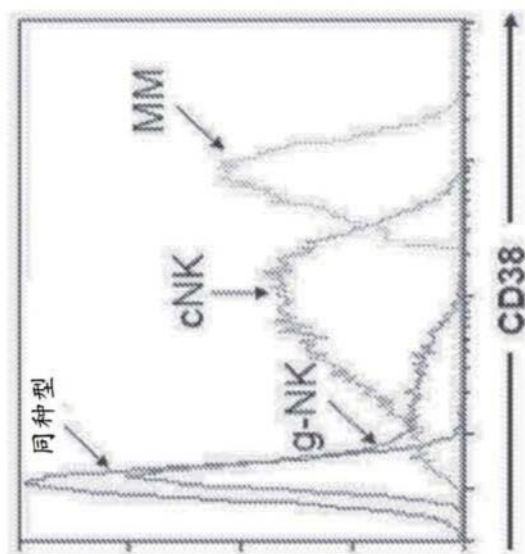


图13F

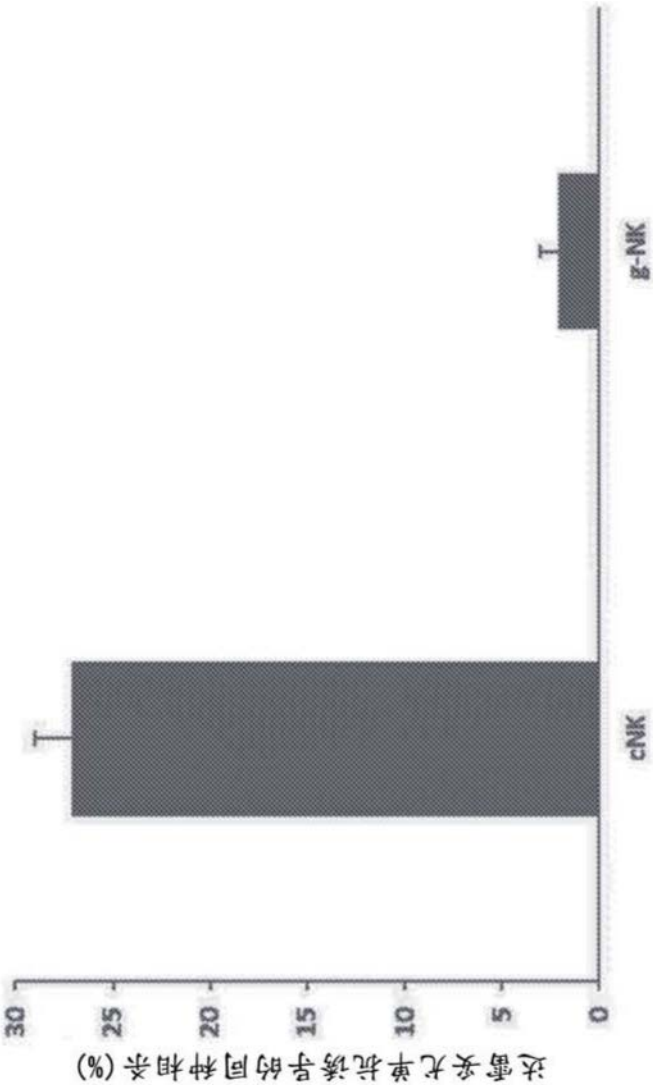


图13G

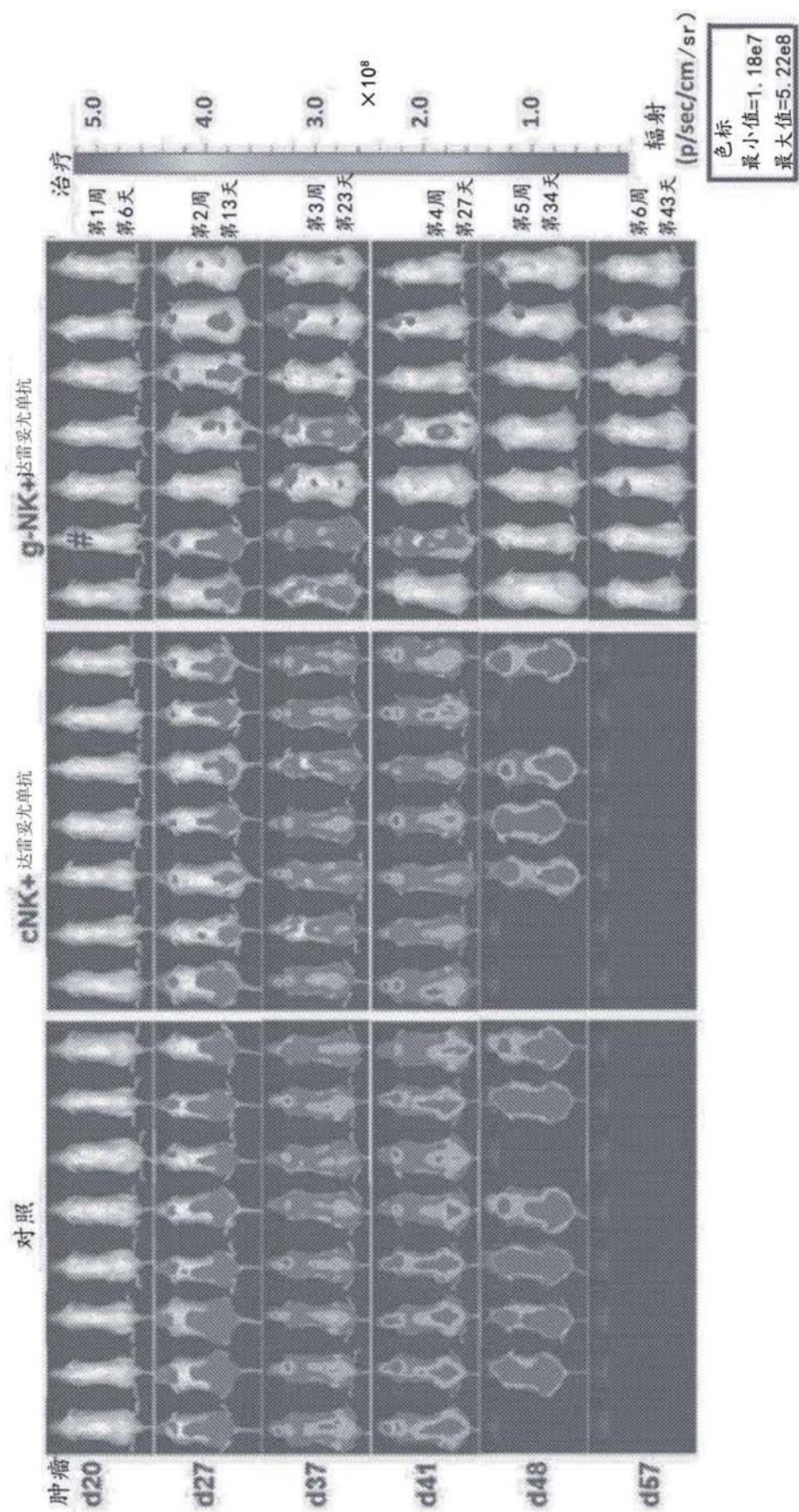


图14A

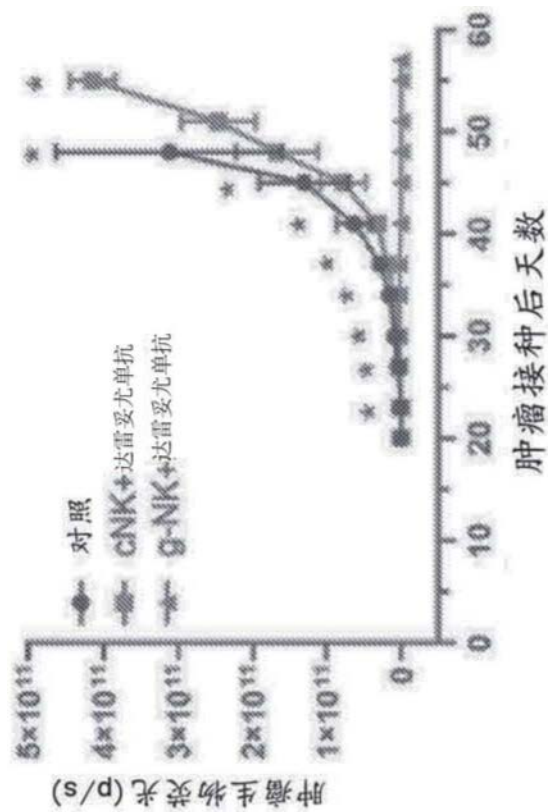


图14B

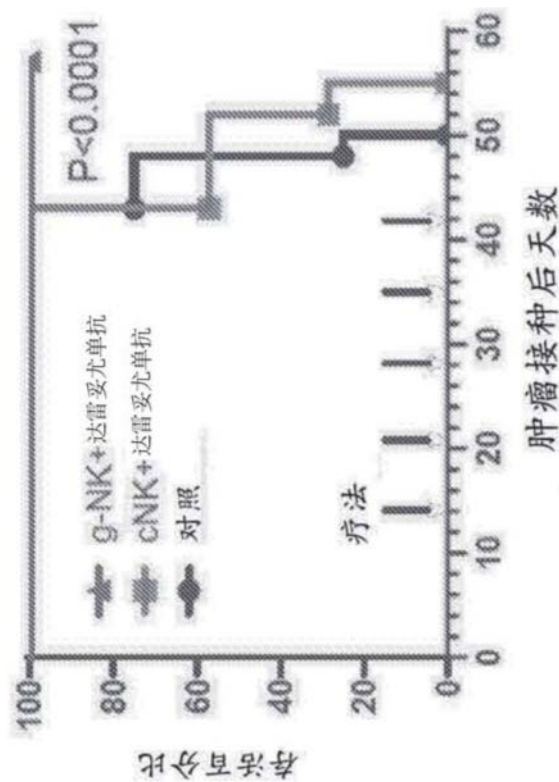


图14C

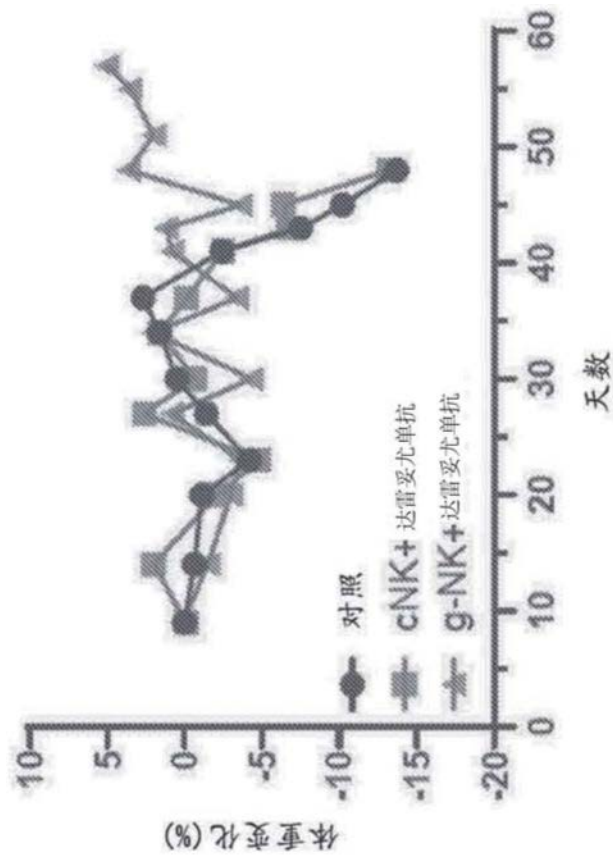


图14D

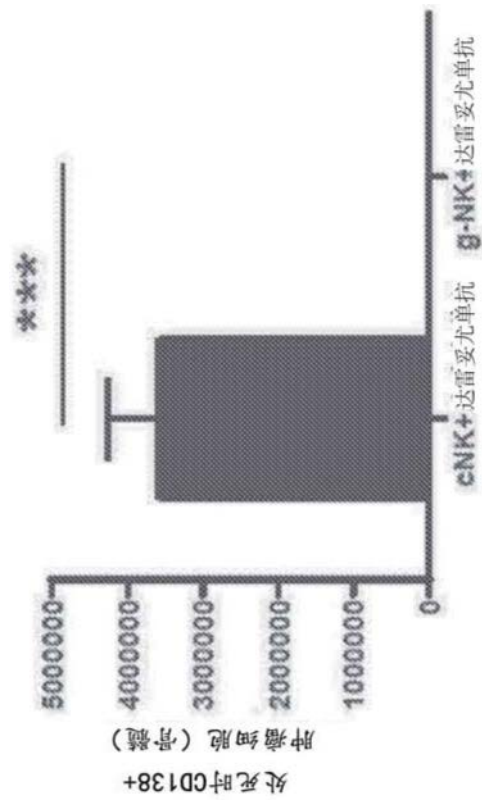


图14E

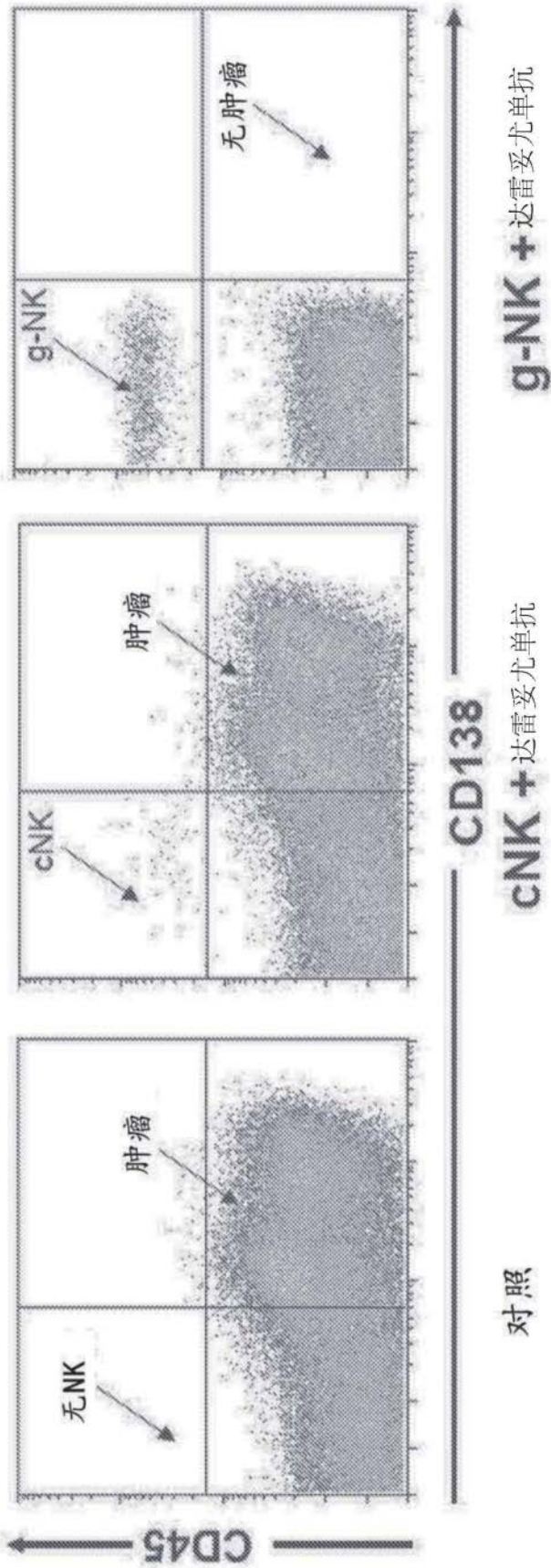


图14F

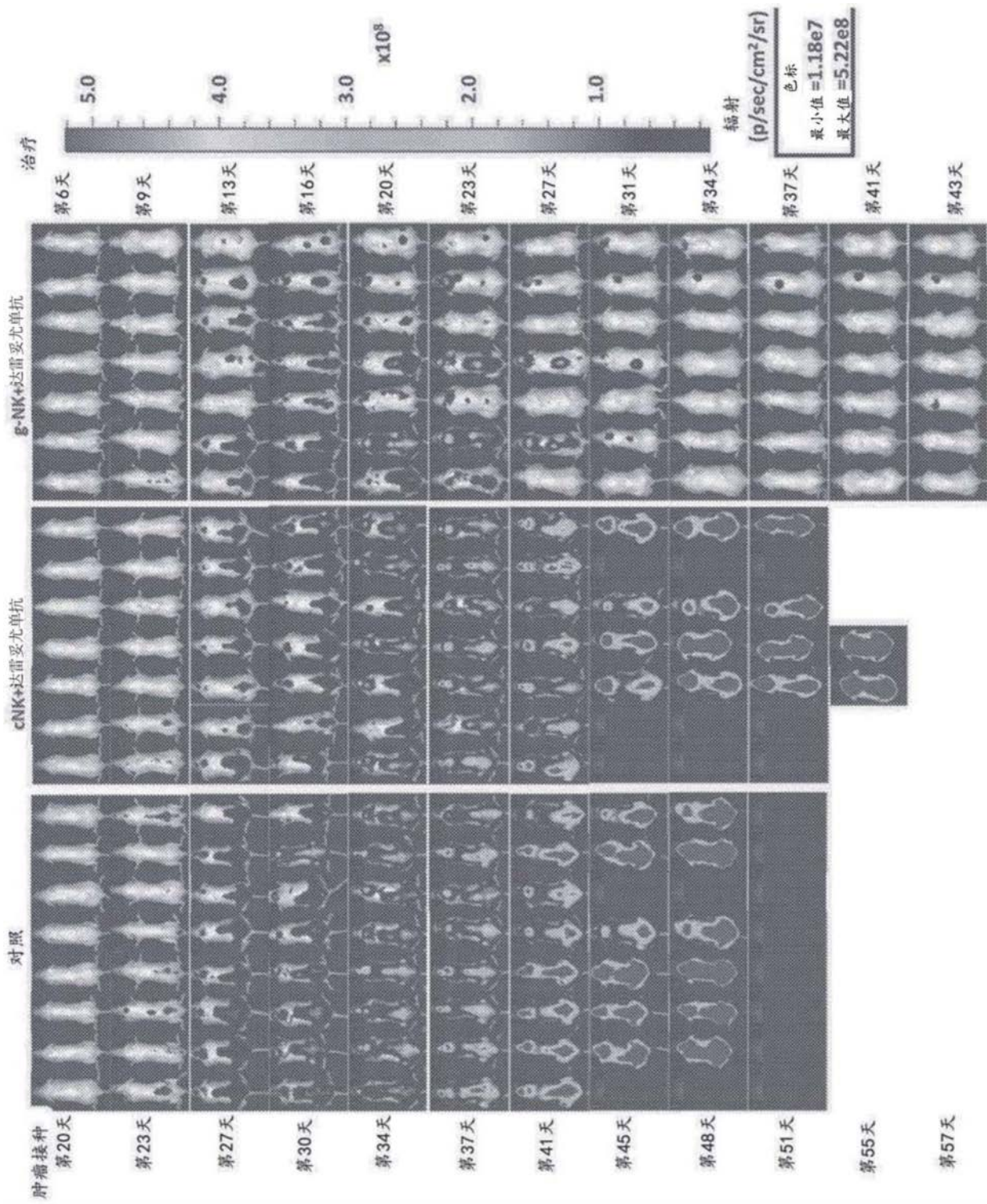


图14G

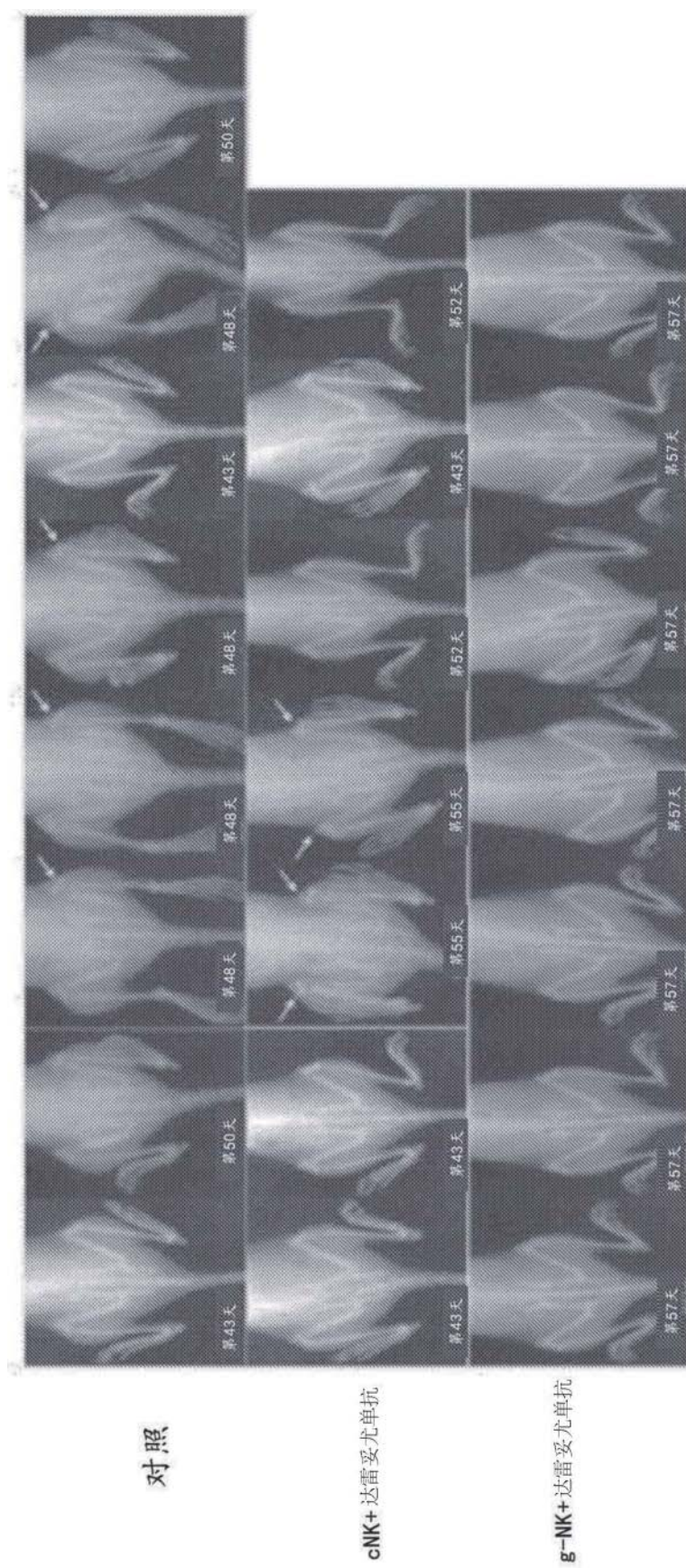


图14H

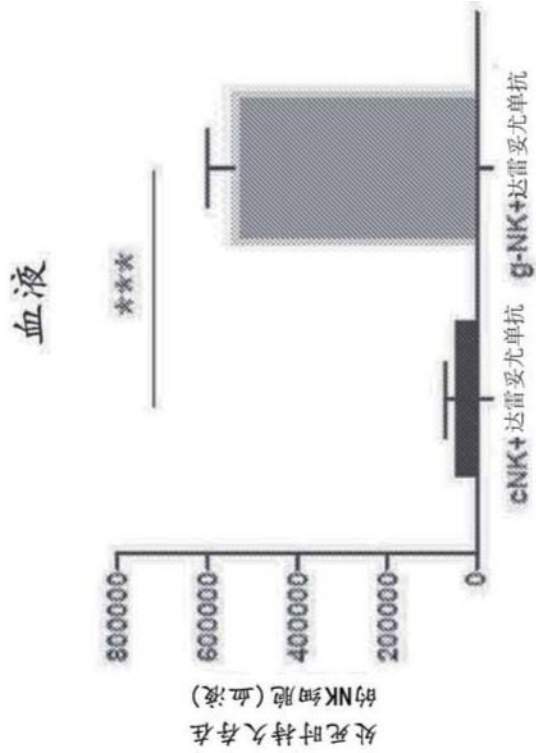


图15A

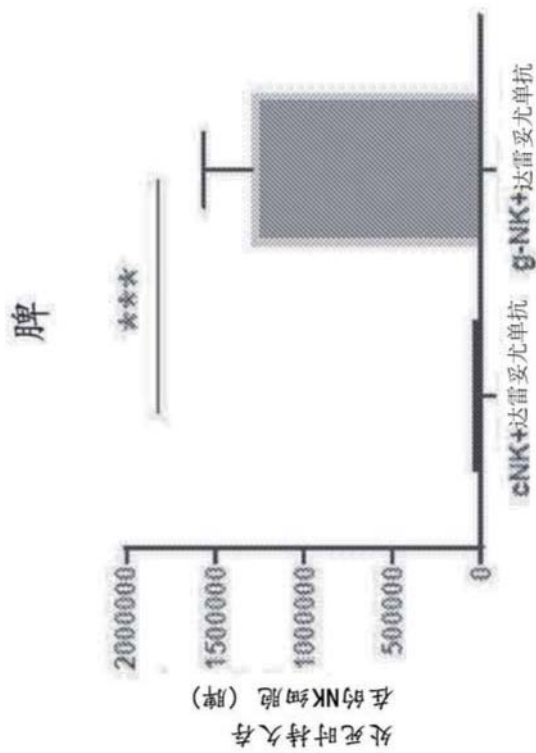


图15B

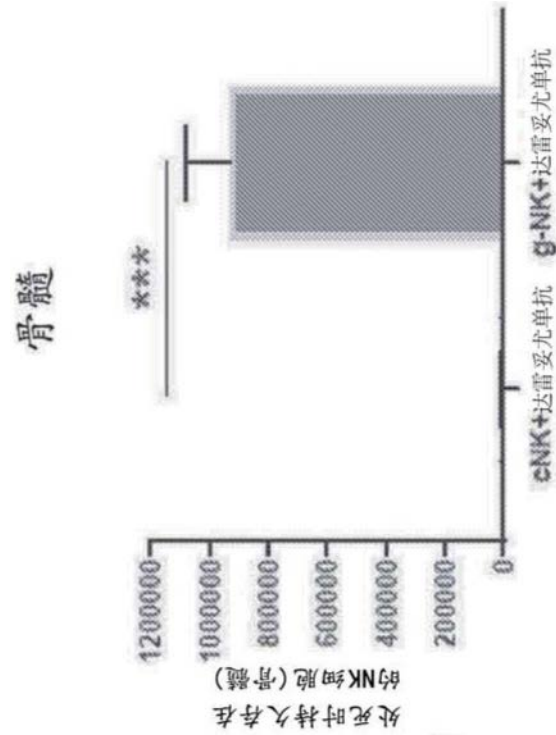


图15C

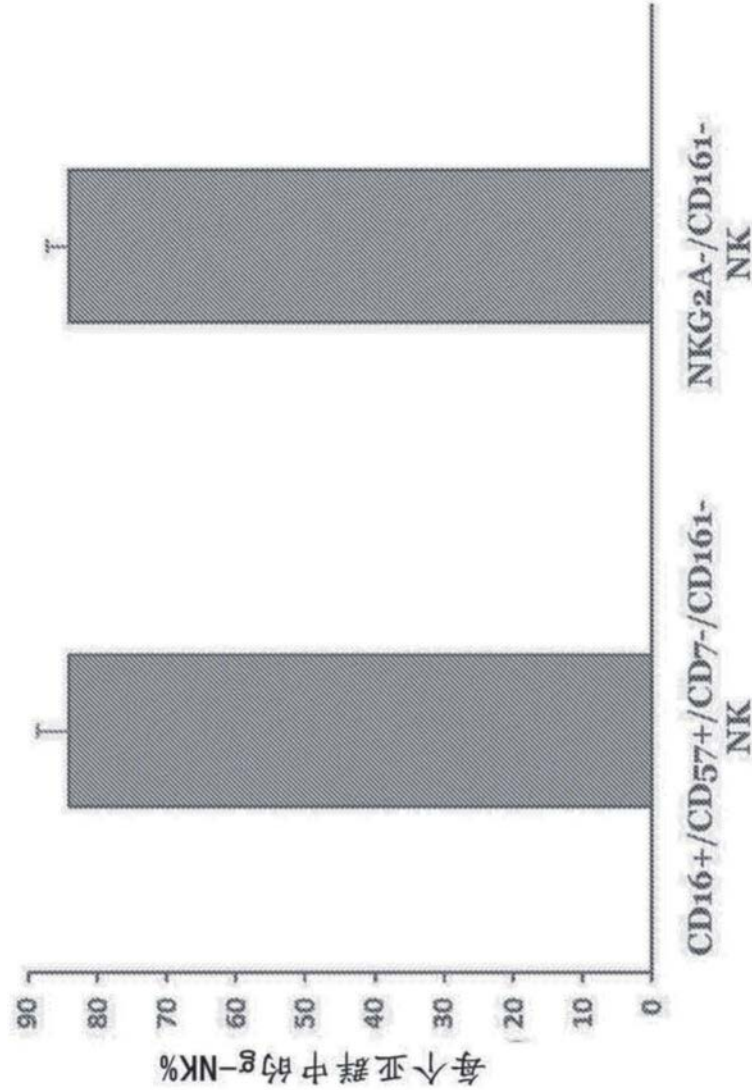


图16

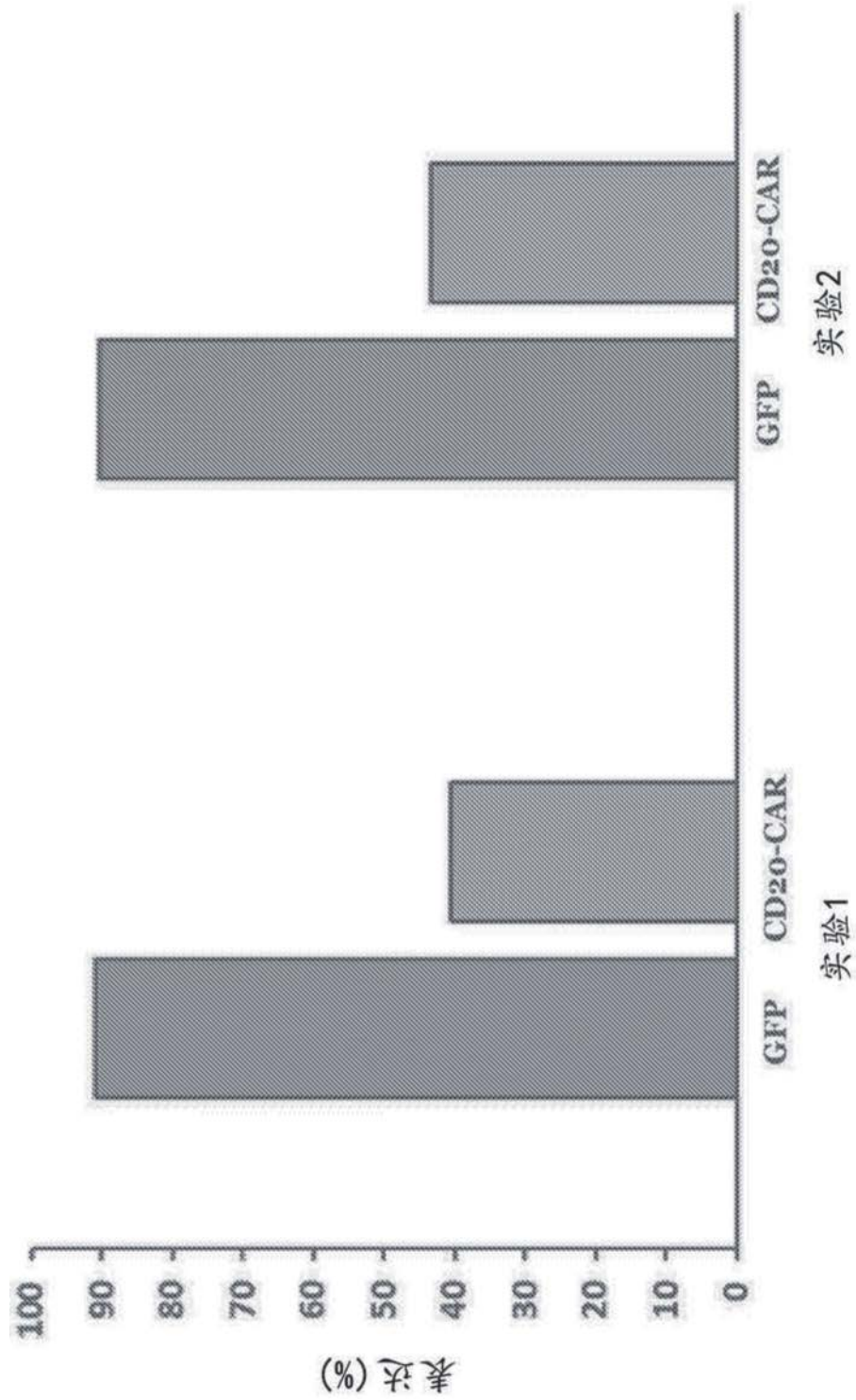


图17

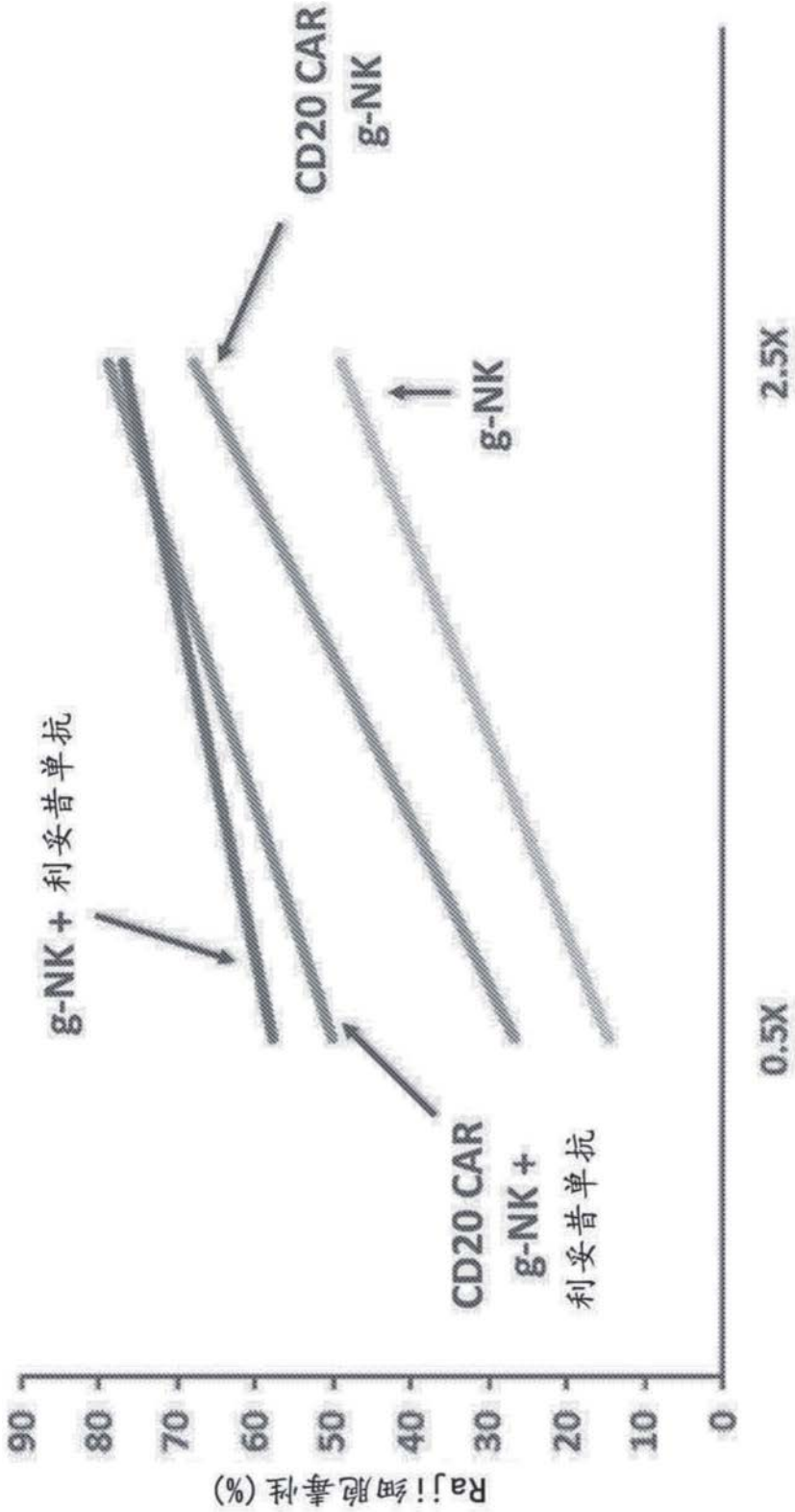


图18