



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112912494 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 201980062358.8

(22) 申请日 2019.07.25

(30) 优先权数据

62/703,654 2018.07.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/070125 2019.07.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/021045 EN 2020.01.30

(71) 申请人 耶稣圣婴儿童医院

地址 意大利罗马

(72) 发明人 C·昆塔雷利 B·德安杰利斯

F·洛卡特利

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书15页 说明书71页 附图13页

(54) 发明名称

$\gamma$ - $\delta$  T细胞和自然杀伤细胞的治疗制剂以及制造和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了制备包含 $\gamma$ . $\delta$  ( $\gamma$   $\delta$ ) T细胞和/或自然杀伤(NK)细胞的先天免疫细胞组合物的方法,以及所得的组合物和相关制造产品和试剂盒,它们用于癌症和传染病疗法中。本文提供的方法允许调整组合物中 $\gamma$ . $\delta$  ( $\gamma$   $\delta$ ) T细胞和自然杀伤(NK)细胞的相对量,以用于针对多种癌症和传染病的细胞疗法。所得的组合物可进一步用于产生仅包含NK细胞或仅包含 $\gamma$ . $\delta$  T细胞的组合物,以用于免疫细胞疗法。本文提供的组合物也可以被遗传改变:将 $\gamma$   $\delta$  T细胞和自然杀伤细胞修饰为表达嵌合抗原受体(CAR)或外源T细胞受体(TCR),其可用于直接或间接地靶向任何细胞表面分子,例如癌细胞或被感染细胞上的标志物。

1. 一种用于制造包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物的方法,其包括:  
从一个或多个受试者获得包含细胞的样品;  
在产生包含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的去除细胞群体的条件下从所述样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞;和  
使所述去除细胞群体暴露于激活条件,包括使所述去除细胞群体与以下多肽接触:(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至不同于所述细胞粘附多肽的多肽并在样品群体的一个或多个细胞的表面上表达的外源多肽;和  
使所述去除细胞群体暴露于扩增条件,包括使所述去除细胞群体与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。
2. 一种用于制造包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物的方法,其包括:  
从一个或多个受试者获得包含细胞的样品;  
使所述样品暴露于激活条件,包括使所述样品与以下多肽接触:(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至不同于所述细胞粘附多肽的多肽并在样品群体的一个或多个细胞的表面上表达的外源多肽,其中(a)或(b)是可溶的,或者(a)和(b)都是可溶的;和  
使所述样品暴露于扩增条件,包括使所述样品与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中选择所述至少一种补充多肽,使得所述群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的量而言,NK细胞的量取决于所述至少一种补充多肽的量和/或类型。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在使所述去除细胞群体与所述至少一种补充多肽接触之后,所述至少一种补充多肽增加或减少细胞群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞而言的NK细胞的量。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述激活条件不含来自非人类动物的血清。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述扩增条件不含来自非人类动物的血清。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述激活条件不含饲养细胞。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述扩增条件不含饲养细胞。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述样品选自外周血、肝组织、骨髓、上皮组织和脐带血。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述样品是外周血。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中外周血样品是处理过的样品。
12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述样品是脐带血。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中脐带血样品是处理过的样品。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中(b)中的所述至少一种外源多肽免疫特异性结合至NK细胞激活受体、 $\gamma$ . $\delta$ T细胞激活受体或两者。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受体是NKp30、NKp44或NKp46。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述受体是NKp46。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中(a)中的所述外源多肽免疫特异性结合至CD2。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中(a)或(b)或者(a)和(b)中的所述外源多肽是抗体或其抗原结合片段。
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中(a)或(b)中的至少一者是可溶的。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中(a)和(b)中的所述外源多肽都是可溶的。
21. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中(a)中的所述外源多肽或(b)中的所述外源多肽结合至底物。
22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述激活条件包括使所述样品或去除细胞群体与至少两种外源多肽接触。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中第一外源多肽免疫特异性结合至CD2,并且第二外源多肽免疫特异性结合至NKp46。
24. 根据权利要求22或权利要求23所述的方法,其中第一外源多肽和/或第二外源多肽是抗体或其抗原结合片段。
25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述激活条件的多肽组分基本上由或由以下组成:
  - (a) 免疫特异性结合至细胞粘附多肽CD2的外源多肽;和
  - (b) 与(a)中的所述外源多肽不同并且免疫特异性结合至NKp46的外源多肽。
26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述至少一种补充多肽是细胞因子和/或与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与至少一种补充多肽接触,所述补充多肽是细胞因子,并且任选地是与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的补充多肽。
28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述细胞因子是白细胞介素(IL)。
29. 根据权利要求26-28中任一项所述的方法,其中所述至少一种补充多肽包括IL-2、IL-4、IL-15或其任何组合。
30. 根据权利要求26-29中任一项所述的方法,其中所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与以下接触:
  - (a) IL-2多肽,和任选地,与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽;
  - (b) IL-15多肽;或
  - (c) IL-2多肽和IL-15多肽,和任选地,与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽。
31. 根据权利要求26-30中任一项所述的方法,其中所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体是CD3。
32. 根据权利要求26-31中任一项所述的方法,其中与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。
33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述扩增条件包括使所述样品与以下接触:
  - (a) IL-2多肽;
  - (b) IL-15多肽;

- (c) IL-2多肽和IL-15多肽;
- (d) IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体;或
- (e) IL-2多肽、IL-15多肽和免疫特异性结合CD3的抗体。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法,其中所述激活条件和扩增条件同时执行或以任何顺序依次执行。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中:  
所述至少一种外源多肽也作为补充多肽起作用;或  
所述至少一种补充多肽也作为外源多肽起作用;或  
所述至少一种外源多肽也作为起补充多肽起作用,并且所述至少一种补充多肽也作为外源多肽起作用。

37. 根据权利要求33-36中任一项所述的方法,其中:

- (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-2多肽接触;和
- (ii) 所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

38. 根据权利要求33-36中任一项所述的方法,其中:

- (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-15多肽接触;和
- (ii) 所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约80-99%的NK细胞和约1-20%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

39. 根据权利要求33-36中任一项所述的方法,其中:

- (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体接触;和
- (ii) 所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述扩增条件包括:

使所述样品或去除细胞群体与包含一种或多种补充多肽的第一组条件接触,从而产生包含第一比率的NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的第一细胞群体;和

使所述第一细胞群体与包含一种或多种补充多肽的第二组条件接触,从而产生包含期望最终比率的NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的第二细胞群体,其中所述第一组条件与所述第二组条件不同。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中在与所述第二组条件接触之前洗涤所述第一细胞群体。

42. 根据权利要求40或权利要求41所述的方法,其中:

- 所述第一组条件包含IL-2,并且所述第二组条件包含IL-15;
- 所述第一组条件包含IL-15,并且所述第二组条件包含IL-2;
- 所述第一组条件包含IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体,并且所述第二组条件包含IL-15;或

所述第一组条件包含IL-15和免疫特异性结合CD3的抗体,并且所述第二组条件包含IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

44. 根据权利要求2-43中任一项所述的方法,其进一步包括:

在将所述样品暴露于激活条件和扩增条件之前,从所述样品中去除 $\alpha$ - $\beta$ T细胞,从而产生去除细胞群体;和

使所述去除细胞群体经历所述激活条件和所述扩增条件,从而获得包含富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。

45. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法,其中在激活和扩增之前,所述样品或所述去除细胞群体不暴露于选择NK细胞或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞或去除除 $\alpha$ - $\beta$ T细胞以外的细胞的条件。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中在激活和扩增之前,所述样品或所述去除细胞群体不暴露于去除所述样品或所述去除细胞群体的所有CD3+细胞的条件。

47. 根据权利要求1-46中任一项所述的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后不包含外源核酸。

48. 根据权利要求1-46中任一项所述的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后不包含编码肿瘤坏死因子受体、嵌合抗原受体(CAR)、髓样分化初级反应蛋白或先天免疫信号转导适配体的外源核酸。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后未被遗传修饰。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体进行处理,从而去除 $\gamma$ - $\delta$ 细胞,并且所得群体基本上由或由NK细胞组成。

51. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体进行处理,从而去除所述NK细胞,并且所得群体基本上由或由 $\gamma$ - $\delta$ T细胞组成。

52. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体进行针对NK细胞的阳性选择,从而获得基本上由或由NK细胞组成的细胞群体。

53. 根据权利要求1-49和51中任一项所述的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体进行针对 $\gamma$ - $\delta$ 细胞的阳性选择,从而获得基本上由或由 $\gamma$ - $\delta$ 细胞组成的细胞群体。

54. 根据权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述扩增条件包括将所述样品或去除细胞群体在无饲养细胞的培养基中孵育约一周至约10周,由此获得包含富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的扩增细胞群体的组合物。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中培养条件包括将所述样品或去除细胞群体在无饲养细胞的培养基中孵育约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、45、50、55或60天或更长时间,或约2、3、4、5、6、7、8、9或10周。

56. 根据权利要求1-55中任一项所述的方法,其中所述富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的细胞群体在所述扩增条件下在30天内扩增大于约2log。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述细胞群体在所述扩增条件下在30天内扩增大于约3log。

58. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法,其中富含NK细胞和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。

59. 根据权利要求1-58中任一项所述的方法,其中在所述扩增条件下在60天后,富含NK

细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。

60. 根据权利要求1-59中任一项所述的方法,其中在富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体中,少于5%、4%、3%或2%的NK细胞包含PD-1标志物,和/或所述扩增群体中总细胞或所述扩增群体中  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的约20%、15%、10%或更少包含PD-1标志物。

61. 根据权利要求1-60中任一项所述的方法,其中富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的细胞群体包含作为所述群体中细胞总数的百分比的一种或多种以下激活标志物:

- (a) 90%或更高的KIR5;
- (b) 10%或更高的SIGLEC-7;
- (c) 60%或更高的KIR3D51;
- (d) 10%或更高的KIR2DL1;
- (e) 25%或更高的NKp30、NKp44或NKp46;
- (f) 35%或更多的NKG2D;
- (g) 90%或更多的DNAM1;
- (h) 85%或更多的NTBA;
- (i) 95%或更高的CD2;和
- (j) 55%或更高的KIR3DS1。

62. 根据权利要求1-61中任一项所述的方法,其中富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的细胞群体包含80%或更多的先天免疫细胞。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中约70%至约100%,或至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞是CD56+。

64. 根据权利要求62或权利要求63所述的方法,其中约10%至约40%,或至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞是CD16+。

65. 根据权利要求62-64中任一项所述的方法,其中少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的细胞是CD57+。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法,其中所述样品或去除细胞群体在激活和扩增期间或之后不包含CD4+CD8+细胞。

67. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述激活条件和所述扩增条件不包括双膦酸盐。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述双膦酸盐是帕米膦酸盐或唑来膦酸盐。

69. 根据权利要求1-68中任一项所述的方法,其中所述  $\gamma$  . $\delta$ T细胞相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述多克隆  $\gamma$  . $\delta$ T细胞包含至少一个选自V. $\delta$ .1+和V. $\delta$ .1-的亚群和至少一个选自V. $\delta$ .2+和V. $\delta$ .2-的亚群。

71. 一种能通过或通过权利要求1至70中任一项的方法获得的组合物。

72. 一种包含修饰的外周血细胞群体的组合物,其中所述群体包含:

多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；  
去除了 $\alpha$ . $\beta$ T细胞；和  
不含饲养细胞。

73. 根据权利要求72所述的组合物，其中：

约25%至约45%的细胞是NK细胞，并且约55%至约75%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；  
约25%至约30%的细胞是NK细胞，并且约70%至约75%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；  
约80%至约99%的细胞是NK细胞，并且约1%至约20%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；或  
约40%至约45%的细胞是NK细胞，并且约55%至约60%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

74. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物，其中30%或更多的细胞被激活。

75. 根据权利要求72-74中任一项所述的组合物，其中修饰的细胞群体包含一种或多种作为所述群体中细胞总数的百分比的以下激活标志物：

- (a) 90%或更高的KIR5；
- (b) 10%或更高的SIGLEC-7；
- (c) 60%或更高的KIR3D51；
- (d) 10%或更高的KIR2DL1；
- (e) 25%或更高的NKp30、NKp44或NKp46；
- (f) 35%或更多的NKG2D；
- (g) 90%或更多的DNAM1；
- (h) 85%或更多的NTBA；
- (i) 95%或更高的CD2；和
- (j) 55%或更高的KIR3DS1。

76. 根据权利要求72-75中任一项所述的组合物，其中修饰的群体包含80%或更多的先天免疫细胞。

77. 根据权利要求72-76中任一项所述的组合物，其中修饰的群体富含激活的细胞毒性细胞，其为CD56+。

78. 根据权利要求72-77中任一项所述的组合物，其中修饰的群体富含激活的细胞毒性细胞，其为CD57-。

79. 根据权利要求72-78中任一项所述的组合物，其中所述群体富含激活的细胞毒性细胞，其为CD56+CD57-。

80. 根据权利要求77-79中任一项所述的组合物，其中约80%至约100%，或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞是CD56+。

81. 根据权利要求77-80中任一项所述的组合物，其中约10%至约40%，或至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞是CD16+。

82. 根据权利要求77-81中任一项所述的组合物，其中少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的细胞是CD57+。

83. 根据权利要求72-82中任一项所述的组合物，其基本上不含除NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞

以外的细胞。

84. 根据权利要求72-83中任一项所述的组合物,其包含少于5%的NKT细胞。
85. 根据权利要求72-84中任一项所述的组合物,其包含少于1%的NKT细胞。
86. 根据权利要求72-85中任一项所述的组合物,其包含少于0.1%的NKT细胞。
87. 根据权利要求72-86中任一项所述的组合物,其包含少于2%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。
88. 根据权利要求72-87中任一项所述的组合物,其包含少于1%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。
89. 根据权利要求72-88中任一项所述的组合物,其包含少于0.1%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。
90. 根据权利要求72-89中任一项所述的组合物,其中所述群体中的NK细胞子集是CD16+细胞。
91. 根据权利要求72-90中任一项所述的组合物,其中大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD57-细胞。
92. 根据权利要求72-91中任一项所述的组合物,其中大多数的NK细胞是CD57-细胞。
93. 根据权利要求72-92中任一项所述的组合物,其中所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。
94. 根据权利要求93所述的组合物,其中多克隆 $\gamma$ . $\delta$ T细胞包含至少一个选自V. $\delta$ .1+和V. $\delta$ .1-的亚群和至少一个选自V. $\delta$ .2+和V. $\delta$ .2-的亚群。
95. 根据权利要求72-94中任一项所述的组合物,其中:  
大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .1,而少数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .2;或  
少数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .1,而大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .2表达。
96. 根据权利要求72-95中任一项所述的组合物,其中:  
所述群体中的少数细胞是CD3阳性细胞,并且所述群体中的大多数细胞是CD3阴性细胞;或  
所述群体中的大多数细胞是CD3阳性细胞,并且所述群体中的少数细胞是CD3阴性细胞。
97. 根据权利要求72-96中任一项所述的组合物,其中NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率大于1。
98. 根据权利要求72-96中任一项所述的组合物,其中NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率小于1。
99. 根据权利要求97所述的组合物,其中所述修饰的细胞群体包含约98-99%的NK细胞和约1-2%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。
100. 根据权利要求98所述的组合物,其中所述修饰的细胞群体包含约25%至约45%的NK细胞和约55%至约75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。
101. 根据权利要求98所述的组合物,其中所述修饰的细胞群体包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。
102. 根据权利要求98所述的组合物,其中所述修饰的细胞群体包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。
103. 根据权利要求72-102中任一项所述的组合物,其中约50%至约99%或更多,或大于或等于约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、



78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8<sup>+</sup>。

104. 根据权利要求103所述的组合物,其中少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD4<sup>+</sup>。

105. 根据权利要求103或权利要求104所述的组合物,其中少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>。

106. 根据权利要求103-105中任一项所述的组合物,其中约15%至约30%的所述NK细胞和/或约55%至85%的所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞中的部分是CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>。

107. 根据权利要求72-106中任一项所述的组合物,其中所述群体中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞进一步包含遗传修饰,所述遗传修饰包括外源多核苷酸、突变的多核苷酸、缺失的多核苷酸或其组合。

108. 根据权利要求107所述的组合物,其中所述群体中至少约95%、96%、97%、98%、99%的细胞包含所述遗传修饰,或所述群体中约100%或100%的细胞包含所述遗传修饰。

109. 根据权利要求107或权利要求108所述的组合物,其中所述遗传修饰包括外源多核苷酸。

110. 根据权利要求109所述的组合物,其中所述外源多核苷酸处于逆转录病毒载体或慢病毒载体中。

111. 根据权利要求109所述的组合物,其中所述外源多核苷酸整合到所述修饰的细胞群体的一个或多个细胞的基因组中。

112. 根据权利要求107-111中任一项所述的组合物,其中所述群体中的细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

113. 根据权利要求112所述的组合物,其中所述嵌合抗原受体包含免疫特异性结合至CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123或CD30中的一个或多个的结合分子部分。

114. 根据权利要求72-113中任一项所述的组合物,其中包含所述多个NK细胞和所述多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的所述群体来源于多于一个受试者的外周血细胞。

115. 一种药物组合物,其包含实施方案72-114中任一项的组合物和药学上可接受的载体。

116. 一种制备遗传修饰的免疫细胞的方法,其包括以下一个或多个:

- (a) 将外源多核苷酸添加到权利要求71-106中任一项的组合物中;
- (b) 使权利要求71-106中任一项的组合物中的一个或多个细胞中的多核苷酸突变;或
- (c) 使权利要求71至106中任一项的组合物中的一个或多个细胞中的多核苷酸缺失。

117. 根据权利要求116所述的方法,其中所述遗传修饰是通过逆转录病毒转导、慢病毒

转导、电穿孔、转染、CRISPR/cas9或TALENs。

118. 根据权利要求116或权利要求117所述的方法,其中所述遗传修饰由或基本上由如(a)中添加外源多核苷酸组成。

119. 根据权利要求116-118中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰包括如(a)中添加外源多核苷酸和/或如(b)中使多核苷酸突变,并且将所述外源多核苷酸和/或突变的多核苷酸整合入所述免疫细胞的基因组。

120. 根据权利要求119所述的方法,其中所述整合是通过电穿孔、转染、CRISPR/cas9或TALENs。

121. 根据权利要求116-121中任一项所述的方法,其中所述外源多核苷酸编码嵌合抗原受体(CAR)。

122. 根据权利要求121所述的方法,其中所述嵌合抗原受体包含免疫特异性结合至CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123或CD30中的一个或多个的结合分子部分。

123. 根据权利要求116-122中任一项所述的方法,其中所述群体中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞包含所述遗传修饰。

124. 根据权利要求123所述的方法,其中所述遗传修饰包括外源多核苷酸。

125. 根据权利要求124所述的方法,其中所述群体中约100%或100%的细胞包含所述外源多核苷酸。

126. 一种试剂盒,其包括根据权利要求71至114中任一项所述的组合物或根据权利要求115所述的药物组合物,任选地包括使用说明书,和任选地包括细胞因子。

127. 根据权利要求126所述的试剂盒,其中所述组合物或所述药物组合物处于负4摄氏度或更低。

128. 根据权利要求127所述的试剂盒,其中所述组合物或所述药物组合物处于约负75摄氏度至约负80摄氏度。

129. 根据权利要求126-128中任一项所述的试剂盒,其包括约 $1 \times 10^5$ 个细胞至约 $1 \times 10^{12}$ 个细胞。

130. 根据权利要求126-129中任一项所述的试剂盒,其中所述细胞因子是白细胞介素多肽。

131. 根据权利要求130所述的试剂盒,其中所述白细胞介素肽是IL-2、IL-4或IL-15。

132. 根据权利要求126-131中任一项所述的试剂盒,其不含非人血清和/或不含牛血清。

133. 根据权利要求126-132中任一项所述的试剂盒,其不含异种成分(xenogen)。

134. 根据权利要求126-133中任一项所述的试剂盒,其不含外源饲养细胞。

135. 根据权利要求126-134中任一项所述的试剂盒,其为单位剂型。

136. 实施方案E10的试剂盒,其中所述单位剂型是约 $1 \times 10^6$ 个细胞至约 $1 \times 10^{12}$ 个细胞。

137. 一种来自不同供体受试者的细胞的集合,其包括多个容器,每个容器包括来自一个或多个供体受试者的细胞,其中每个容器包括根据权利要求71-114中任一项所述的组合物、根据权利要求115所述的药物组合物或根据权利要求126-136中任一项所述的试剂盒。

138. 一种治疗癌症或感染的方法,其包括以有效治疗所述癌症或感染的量向有需要的受试者施用根据权利要求71-114中任一项所述的组合物、根据权利要求115所述的药物组合物或根据权利要求126-136中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物、所述药物组合物或试剂盒中的细胞相对于所述受试者是同种异体的。

139. 一种治疗癌症或感染的方法,其包括以有效治疗所述癌症或感染的量向有需要的受试者施用根据权利要求71-114中任一项所述的组合物、根据权利要求115所述的药物组合物或根据权利要求126-136中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物、所述药物组合物或试剂盒中的细胞相对于所述受试者是自体的。

140. 根据权利要求138或权利要求139所述的方法,其包括在两个或更多个分开的天向所述受试者施用所述组合物。

141. 根据权利要求139或权利要求140所述的方法,其中所述细胞的供体是所述治疗的接受者。

142. 根据权利要求138或权利要求140所述的方法,其中所述细胞的供体不是所述治疗的接受者。

143. 根据权利要求142所述的方法,其中如果用来自供体的 $\alpha$ .BT细胞治疗,则所述治疗的接受者对GvHD敏感。

144. 根据权利要求138-143中任一项所述的方法,其中所述治疗以约1单位剂量至约36或更多单位剂量、以约2周至约4周的间隔施用。

145. 根据权利要求138-143中任一项所述的方法,其中所述治疗以单一单位剂量每天一次、两次、三次、四次或至多五次,或在数天、数周或数月的时间内一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,或隔日一次,或者一周一次、两次、三次、四次、五次或六次施用。

146. 根据权利要求138-145中任一项所述的方法,其中所述治疗通过静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)、腹膜内(IP)、胸膜内、关节腔内施用或在癌症或感染的部位处或附近注射或植入。

147. 根据权利要求144-146中任一项所述的方法,其中所述单位剂量包括每千克受试者体重约 $10^4$ 个至约 $10^{10}$ 个细胞,或每名受试者约 $10^6$ 个至约 $10^{12}$ 个细胞。

148. 根据权利要求147所述的方法,其中所述单位剂量是每名受试者约 $10^{10}$ 个细胞,或每千克受试者体重约 $10^8$ 个细胞。

149. 根据权利要求138-148中任一项所述的方法,其中所述治疗是针对癌症。

150. 根据权利要求149所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病或淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或儿童急性淋巴母细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、肥大细胞瘤或肥大细胞肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、乳腺肿瘤、结肠直肠癌、白血病、淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)或急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、组织细胞肉瘤、脑肿瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经瘤、结肠癌、宫颈癌、肉瘤、膀胱肿瘤、网

状内皮组织肿瘤、威尔姆氏瘤、骨癌、骨肉瘤、肾癌或头颈癌、口腔癌、喉癌、转移性疾病或咽喉癌。

151. 根据权利要求149或权利要求150所述的方法, 其中将第二药剂与所述组合物、药物组合物或试剂盒共同施用。

152. 根据权利要求151所述的方法, 其中所述第二药剂是与癌症相关抗原免疫特异性结合的抗体。

153. 根据权利要求152所述的方法, 其中所述癌症相关抗原选自由以下组成的组: 甲胎蛋白 (AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM-5)、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子 (FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- $\beta$ 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、PD1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、生存素 (survivin)、生存素-2B、TAC、TAG-72、肌腱蛋白、TRAIL受体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bc1-2、bc1-6和Kras。

154. 根据权利要求152或权利要求153所述的方法, 其中所述抗体选自hR1 (抗IGF-1R)、hPAM4 (抗粘蛋白)、KC4 (抗粘蛋白)、hA20 (抗CD20)、hA19 (抗CD19)、hIMMU31 (抗AFP)、hLL1 (抗CD74)、hLL2 (抗CD22)、抗CD19/CD22双特异性抗体、RFB4 (抗CD22)、hMu-9 (抗CSAp)、hL243 (抗HLA-DR)、hMN-14 (抗CEACAM-5)、hMN-15 (抗CEACAM-6)、hRS7 (抗TROP-2)、hMN-3 (抗CEACAM-6)、CC49 (抗TAG-72)、J591 (抗PSMA)、D2/B (抗PSMA)、G250 (抗碳酸酐酶IX)、迪妥昔单抗 (抗GD2)、英夫利昔单抗 (抗TNF- $\alpha$ )、赛妥珠单抗聚乙二醇 (抗TNF- $\alpha$ )、阿达木单抗 (抗TNF- $\alpha$ )、阿仑单抗 (抗CD52)、贝伐单抗 (抗VEGF)、西妥昔单抗 (抗EGFR)、吉妥单抗 (抗CD33)、替伊莫单抗 (抗CD20)、帕尼单抗 (抗EGFR)、利妥昔单抗 (抗CD20)、托西莫单抗 (抗CD20)、GA101 (抗CD20)、曲妥珠单抗 (抗HER2/neu)、托珠单抗 (抗IL-6受体)、巴利昔单抗 (抗CD25)、达克珠单抗 (抗CD25)、依法珠单抗 (抗CD11a)、莫罗单抗-CD3 (抗CD3受体)、那他珠单抗 (抗 $\alpha$ 4整联蛋白)、BWA-3 (抗组蛋白H2A/H4)、LG2-1 (抗组蛋白H3)、MRA12 (抗组蛋白H1)、PR1-1 (抗组蛋白H2B)、LG11-2 (抗组蛋白H2B) 和LG2-2 (抗组蛋白H2B)。

155. 根据权利要求138-148中任一项所述的方法, 其中所述治疗是针对感染。

156. 根据权利要求155所述的方法,其中所述感染是通过细菌、真菌、病毒或原生动物病原体的存在来表征的。

157. 根据权利要求156所述的方法,其中所述感染选自由以下组成的组:疱疹、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、牛痘病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒(例如HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口腔炎病毒(VSV)、杆菌(Bacilli)、柠檬酸杆菌(Citrobacter)、霍乱(Cholera)、白喉(Diphtheria)、肠杆菌(Enterobacter)、淋球菌(Gonococci)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、克雷伯菌属(Klebsiella)、军团菌属(Legionella)、脑膜炎球菌(Meningococci)、分枝杆菌(myco bacteria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、肺炎球菌(Pneumococci)、立克次氏菌(rickettsia bacteria)、沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)、葡萄球菌属(Staphylococci)、链球菌属(Streptococci)、破伤风(Tetanus)、曲霉属(Aspergillus)(烟曲霉(A.fumigatus)、黑曲霉(A.niger)等)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、念珠菌属(Candida)(白色念珠菌(C.albicans)、克鲁斯念珠菌(C.krusei)、光滑念珠菌(C.glabrata)、热带念珠菌(C.tropicalis)等)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、毛霉菌属(Genus Mucorales)(毛霉菌(mucor)、犁头霉(absidia)、根霉(rhizopus))、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenkii)、巴西芽生菌(Paracoccidioides brasiliensis)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、钩端螺旋体病(Leptospirosis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、蠕虫寄生虫(helminth parasite)(钩虫(hookworm)、绦虫(tapeworms)、吸虫(flukes)、扁虫(flatworms)(例如血吸虫病(Schistosomia))、蓝氏贾第虫(Giardia lamblia)、旋毛虫(trichinella)、脆弱双核阿米巴(Dientamoeba Fragilis)、布氏锥虫(Trypanosoma brucei)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)或杜氏利什曼虫(Leishmania donovani)。

158. 一种细胞的治疗组合物,其包含:多个 $\gamma\delta$ T细胞( $\gamma\delta$ );多个自然杀伤细胞(NK);或 $\gamma\delta$ 和NK细胞的组合。

159. 根据权利要求158所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞是经过重组工程化的或遗传修饰的,

其中任选地,所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞被重组工程化或遗传修饰以在细胞外表达外源或异源蛋白质,

并且任选地,所述外源、异源或嵌合蛋白质是嵌合抗原受体(CAR)或外源或异源T细胞受体(TCR),

并且任选地,所述外源、异源或嵌合蛋白质或CAR对癌细胞或肿瘤标志物或被感染细胞具有特异性(可以与其特异性结合),或所述外源、异源或嵌合蛋白质或CAR对能够特异性靶向并结合癌细胞或肿瘤标志物或被感染细胞或任何疾病相关抗原的抗体具有特异性(可以与其特异性结合)。

160. 根据权利要求158或权利要求159所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞是人类细胞或动物细胞。

161. 根据权利要求158-160中任一项所述的细胞的治疗组合物,其中所述治疗组合物被配制用于静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)施用,或被配制为单位剂型,其中任选地,单位

剂量包含约 $10^2$ 个至 $10^{12}$ 个细胞。

162. 根据权利要求158-161中任一项所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞是从体内来源分离的。

163. 根据权利要求158-162中任一项所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞在培养中扩增或从体内来源分离并在培养中扩增。

164. 根据权利要求163所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞从体内来源分离并不使用任何饲养细胞或不使用饲养细胞层的情况下在培养中扩增,从而产生缺乏饲养细胞的 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的扩增群体。

165. 根据权利要求163所述的细胞的治疗组合物,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞从体内来源分离并使用饲养细胞或饲养细胞层在培养中扩增,其中任选地,所述饲养细胞被基本上去除和/或杀死以产生基本上缺乏饲养细胞的 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的扩增群体。

166. 根据权利要求158-165中任一项所述的细胞的治疗组合物,

其中 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的所述体内来源来自自体来源(任选地,来自将成为所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的接受者的个体),或外源、异源或同种异体来源。

167. 一种治疗癌症、肿瘤、功能失调细胞或被感染细胞的方法,其包括:

(a) 对有需要的个体施用治疗有效量的根据前述权利要求中任一项所述的细胞的治疗组合物,或

(b) (i) 提供或已经提供了前述权利要求任一项中所述的细胞的治疗组合物;和

(ii) 向有需要的个体施用或已经施用了治疗有效量的所述细胞的治疗组合物。

168. 根据权利要求167所述的方法,其中所述有需要的个体是人或动物。

169. 根据权利要求167或权利要求168所述的方法,其中所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞是从体内来源分离的,并且任选地,所述体内来源 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞来自同基因或自体来源(任选地,来自将成为所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的接受者的个体),或外源、异源或同种异体来源,或其组合。

170. 根据权利要求167-169中任一项所述的方法,其中所述细胞的治疗组合物通过静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)施用,或者在癌细胞、肿瘤细胞、功能失调细胞或被感染细胞中或附近(邻近)被注射或植入,并且任选地,所述细胞的治疗组合物以植入物或凝胶的形式递送,其中任选地,所述凝胶是水凝胶。

171. 根据权利要求167至170中任一项所述的方法,其中所述细胞的治疗组合物以单位剂型施用,其中任选地,单位剂量包括约 $10^2$ 个至 $10^{12}$ 个细胞或 $10^4$ 个至 $10^{10}$ 个细胞;或每日剂量包括约 $10^2$ 个至 $10^{12}$ 个细胞或 $10^4$ 至 $10^{10}$ 个细胞。

172. 根据权利要求167-171中任一项所述的方法,其中所述细胞的治疗组合物或单位剂型在数天、数周或数月的过程中向所述有需要的个体施用数次(多次)或两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,并且任选地,多个单位剂型中的每一个被每天施用一次;每隔一天施用一次;每周施用2、3、4、5或6次;或每周施用一次。

173. 根据权利要求167-172中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤是:肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病或淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或儿童急性淋巴母细胞白血病、肥大细胞瘤或肥大细胞肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、乳腺肿瘤、结肠直肠癌、白血

病、淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)或急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、组织细胞肉瘤、脑肿瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经瘤、结肠癌、宫颈癌、肉瘤、膀胱肿瘤、网状内皮组织肿瘤、威尔姆氏瘤、骨癌、骨肉瘤、肾癌或头颈癌、口腔癌、喉癌或咽喉癌。

174. 根据权利要求167-173中任一项所述的方法,其中,有需要的个体首先通过向所述有需要的个体预先给药针对癌症相关或肿瘤相关、感染相关或疾病相关抗原的未结合抗体,随后施用根据前述权利要求中任一项所述的细胞的治疗组合物,被诱导起始针对癌症、感染或疾病的免疫反应,其中所述细胞的治疗组合物中的至少一些在其细胞表面上表达与所述未结合抗体特异性结合的多肽,任选地是CAR。

175. 根据权利要求167-174中任一项所述的方法,其中向所述有需要的个体施用能够特异性结合癌症相关或肿瘤相关、感染相关或疾病相关抗原的抗体,随后施用根据前述权利要求中任一项所述的细胞的治疗组合物,其中所述细胞的治疗组合物中的至少一些在其细胞表面上表达与所述抗体特异性结合的多肽,任选地是CAR,

并且任选地,在施用所述细胞的治疗组合物之前、期间或之后施用所述抗体。

176. 根据权利要求167-175中任一项所述的方法,其中所述癌症相关或肿瘤相关抗原选自自由以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM-5)、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- $\beta$ 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、GD2(在神经外胚层起源的肿瘤上表达的双唾液酸神经节苷脂)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、PD1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、生存素、生存素-2B、TAC、TAG-72、肌腱蛋白、TRAIL受体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6和Kras。

177. 根据权利要求174或175所述的方法,其中所述抗体或所述未结合抗体选自自由以下组成的组:hR1(抗IGF-1R)、hPAM4(抗粘蛋白)、KC4(抗粘蛋白)、hA20(抗CD20)、hA19(抗CD19)、hIMMU31(抗AFP)、hLL1(抗CD74)、hLL2(抗CD22)、RFB4(抗CD22)、hMu-9(抗CSAp)、hL243(抗HLA-DR)、hMN-14(抗CEACAM-5)、hMN-15(抗CEACAM-6)、hRS7(抗TROP-2)、hMN-3(抗CEACAM-6)、CC49(抗TAG-72)、J591(抗PSMA)、D2/B(抗PSMA)、G250(抗碳酸酐酶IX)、英夫利

昔单抗(抗TNF- $\alpha$ )、赛妥珠单抗聚乙二醇(抗TNF- $\alpha$ )、阿达木单抗(抗TNF- $\alpha$ )、阿仑单抗(抗CD52)、贝伐单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(抗CD20)、帕尼单抗(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、GA101(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗HER2/neu)、托珠单抗(抗IL-6受体)、巴利昔单抗(抗CD25)、达克珠单抗(抗CD25)、依法珠单抗(抗CD11a)、莫罗单抗-CD3(抗CD3受体)、那他珠单抗(抗 $\alpha$ 4整联蛋白)、BWA-3(抗组蛋白H2A/H4)、LG2-1(抗组蛋白H3)、MRA12(抗组蛋白H1)、PR1-1(抗组蛋白H2B)、LG11-2(抗组蛋白H2B)和LG2-2(抗组蛋白H2B)。



## $\gamma$ - $\delta$ T细胞和自然杀伤细胞的治疗制剂以及制造和使用方法

### [0001] 相关专利申请

[0002] 本专利申请要求于2018年7月26日提交的名称为《 $\gamma$ - $\delta$ T细胞和自然杀伤细胞的治疗制剂及其制备和使用方法 (THERAPEUTIC PREPARATIONS OF GAMMA-DELTA T CELLS AND NATURAL KILLER CELLS AND METHODS FOR MAKING AND USING THEM)》的美国临时专利申请号62/703,654的权益,指定Concetta QUINTARELLI等人作为发明人并由律师档案号6474-131400指定。出于所有目的,前述申请的全部内容通过引用并入本文,包括所有文本、表格和附图。

### 技术领域

[0003] 本技术部分涉及用于治疗先天免疫细胞组合物,以及制备和使用此类组合物的方法。

### 背景技术

[0004] 对抗原呈递病原体及其他外来抗原呈递实体的免疫反应包括先天性防御和适应性防御。先天性免疫反应是免疫防御的第一线,其在宿主中是活跃的并持续起作用。先天免疫细胞,例如NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ ( $\gamma$  $\delta$ )T细胞无法识别经典的HLA抗原。适应性免疫反应是专门对抗原呈递剂(例如异物、细胞或微生物)定制的反应,并且通常可能需要若干天才能成熟。使用天然或修饰的(例如CAR修饰的)适应性免疫细胞(例如, $\alpha$ . $\beta$ ( $\alpha\beta$ )T细胞、树突状细胞、巨噬细胞)进行免疫治疗。例如, $\alpha\beta$ T细胞在体内结合抗原呈递剂上的配体后会扩增,这可能需要数天甚至数周的时间。另外, $\alpha\beta$ T细胞的结合是通过一种或多种识别由HLA基因复合物编码的MHC I类和II类配体的T细胞表面分子或分子复合物(包括CD4、CD8和T细胞受体(TCR))进行(Miceli等人,Semin.Immunol.,3(3):133-141(1991))。

### 发明内容

[0005] 本文提供了与免疫学和医学有关的组合物,制备这些组合物的方法以及使用这些组合物的治疗方法。在某些方面,提供了用于各种细胞疗法的包含 $\gamma$  $\delta$ T细胞( $\gamma$  $\delta$ )、自然杀伤细胞(NK)或两者的组合的组合物(包括制造产品和试剂盒)和方法。还提供了制备可以被遗传改变的用于这些疗法中的 $\gamma$  $\delta$ T细胞( $\gamma$  $\delta$ )和自然杀伤细胞(NK)的方法。在替代方面,对遗传改变的 $\gamma$  $\delta$ T细胞( $\gamma$  $\delta$ )和自然杀伤细胞(NK)进行修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)或外源或异源T细胞受体(TCR),其可用于直接或间接地靶向任何细胞表面分子,例如癌细胞或被感染细胞上的标志物。

[0006] 在某些方面提供了用于制造包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物的方法。在本文提供的方法的某些方面,将从供体获得的样品(例如,来自健康受试者或作为要用细胞群体治疗的患者的受试者的组织、器官或血液样品)暴露于激活条件,所述激活条件包括(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至与细胞粘附多肽不同的多肽并在样品的一个或多个细胞的表面上表达的外源多

肽;并暴露于扩增条件下,所述扩增条件包括使样品与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。样品有时会依序暴露于激活条件下,然后再暴露于扩增条件下。本文提供的方法可以生成具有高激活水平的细胞群体,所述高激活水平为所述群体中约30%至约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的细胞,或所述群体中至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多,至多100%的细胞。

[0007] 部分地基于可获得的核酸和氨基酸序列以及细胞粘附分子和其他免疫细胞分子和受体的其他知识,能够容易地鉴别和分离、合成或以其他方式获得(包括从商业来源获得)用于本文提供的方法中的所述外源多肽和补充多肽。在某些方面,所述外源多肽是人的。在一些方面,所述外源多肽是分离的。在某些方面,所述补充多肽是人的。在一些方面,所述补充多肽是分离的。

[0008] 在本文提供的方法的某些方面中,样品在暴露于激活和扩增条件之前被去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞,并且所得的去除细胞群体然后有时暴露于激活和扩增条件。在某些方面,以上(a)中的外源多肽、以上(b)中的外源多肽、或以上(a)中的外源多肽和以上(b)中的外源多肽两者是可溶的。在一些方面,(a)中的外源多肽或(b)中的外源多肽结合至固体底物。

[0009] 在本文提供的方法的一些方面中,选择至少一种补充多肽,使得群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的量而言,NK细胞的量取决于所述至少一种补充多肽的量和/或类型。在某些方面,在使去除细胞群体与至少一种补充多肽接触之后,补充多肽增加或减少细胞群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞而言的NK细胞的量。在某些方面,选择样品或去除了 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的样品暴露于扩增条件的时间,从而获得NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的期望比率。

[0010] 在本文提供的方法的某些方面,激活条件不含来自非人类动物的血清。在本文提供的方法的一些方面,扩增条件不含来自非人类动物的血清。

[0011] 在本文提供的方法中,通常在不使用饲养细胞的情况下激活高百分比的细胞。有时,在不使用饲养细胞的情况下激活群体中至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多,至多100%的细胞。因此,在本文提供的方法的某些方面,激活条件不含饲养细胞。在本文提供的方法的一些方面,扩增条件不含饲养细胞,并且有时激活条件和扩增条件均不含饲养细胞。

[0012] 在本文提供的方法中,任何来源的免疫细胞都可以用作样品。在某些方面,样品选自骨髓、外周血、肝组织、上皮组织和脐带血。在本文提供的方法的一些方面,样品不是源自胚胎来源。在本文提供的方法的某些方面,样品是外周血,并且在一些方面,外周血样品是在经受本文提供的方法中的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除之前被处理的处理过的样品。例如,可以通过密

度梯度离心法处理外周血样品,以分开和/或分离出含有白细胞、血小板、粒细胞等的血沉棕黄层,然后可以根据本文提供的方法对其进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。在某些方面,血沉棕黄层可以进一步经历Ficoll梯度分离以获得单核细胞(PBMC),然后可以在本文提供的方法中对其进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。在一些方面,外周血样品可以经历单采血液成分法以将细胞与血浆分离,并且然后有时在本文提供的方法中对细胞进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。在本文提供的方法的某些方面,样品是脐带血,并且有时脐带血是在经受本文提供的方法中的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除之前被处理的处理过的脐带血。

[0013] 在本文提供的方法的某些方面,(b)中的外源多肽免疫特异性结合至NK细胞激活受体、 $\gamma$ . $\delta$ T细胞激活受体或两者。这些受体包括但不限于CD2、CD3、CD56、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2A、NKG2C、NKG2D、KAR受体、KIR受体、SIGLEC-7、KIR3DS1、KIR3D51、KIR2DL1(抗体:11PB6)、DNAM1、NTBA、HLA-DR等。在一些方面,受体是NKp46。在本文提供的方法的某些方面,(a)中的外源多肽免疫特异性结合至CD2。在一些方面,(a)或(b)或者(a)和(b)中的外源多肽是抗体或其抗原结合片段。为了本文的目的,“抗体”的叙述包括全长抗体及其部分,包括抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段、单链Fv(scFv)、单链Fab(scFab)、双价抗体、抗独特型(anti-Id)抗体或上述任何一者的抗原结合片段。抗体还包括合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和细胞内抗体(intrabodies)。抗体可以包括任何免疫球蛋白类型(例如IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)、任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类(例如IgG2a和IgG2b)的成员。

[0014] 在本文提供的方法的某些方面,激活条件包括使样品或去除细胞群体与至少两种外源多肽接触。在一些方面,第一外源多肽免疫特异性结合至CD2,并且第二外源多肽免疫特异性结合至NKp46。在一些方面,激活条件由或基本上由免疫特异性结合至CD2的第一外源多肽和免疫特异性结合至NKp46的第二外源多肽组成。在某些方面,免疫特异性结合至CD2的外源多肽、免疫特异性结合至NKp46的外源多肽、或免疫特异性结合至CD2的外源多肽和免疫特异性结合至NKp46的外源多肽两者是可溶的。在某些方面,所述第一外源多肽和/或所述第二外源多肽是抗体或其抗原结合片段。

[0015] 在本文提供的方法的某些方面,扩增条件包括、由或基本上由至少一种补充多肽组成,所述补充多肽是细胞因子和/或与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽;和/或其与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的部分。在某些方面,细胞因子是白细胞介素,例如IL-1(参见例如GenBank登录号BC008678.1)、IL-2(参见例如GenBank登录号S77834.1)、IL-4(参见例如GenBank登录号BC070123.1)、IL-7(参见例如GenBank登录号BC047698.1)、IL-9(参见例如GenBank登录号BC066285.1)、IL-15(参见例如GenBank登录号BC100962.1;100963.1;100961.1)、IL-21(参见例如GenBank登录号LC133256.1)或其任何组合。在本文提供的方法的一些方面,细胞因子是IL-2、IL-15或其组合。在某些方面,扩增条件包括、由或基本上由IL-2、IL-15和与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽组成。在某些方面, $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体是CD3。在一些方面,与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的CD3受体免疫特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段,并且在某些方面,所述抗体是OKT3。在某些方面,扩增条件包括使样品或去除细胞群体与以下多肽接触:(a) IL-2多肽;(b) IL-15多肽;(c) IL-2多肽和IL-15多肽;(d) IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体;或(e) IL-2多肽、IL-15多肽和免疫特异

性结合CD3的抗体。在一些方面,免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

[0016] 在某些方面,扩增条件包括将样品(例如,来源样品或已被去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的样品细胞群体)依序暴露于多于一组条件。在某些方面,样品暴露于两组扩增条件。在一些方面,暴露于第一组扩增条件的细胞群体在暴露于第二组扩增条件之前被洗涤。在某些方面:(a)第一组条件包括IL-2并且第二组条件包括IL-15;(b)第一组条件包括IL-15并且第二组条件包括IL-2;(c)第一组条件包括IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体并且第二组条件包括IL-15;或(d)第一组条件包括IL-15和免疫特异性结合CD3的抗体并且第二组条件包括IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体。

[0017] 在本文提供的方法的某些方面,包括一种或多种补充多肽的第一组扩增条件通常生成包含第一比率的NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的第一细胞群体,然后可以使用第二组扩增条件将其微调至NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的期望最终比率,其中第一组条件不同于第二组条件。

[0018] 在本文提供的方法中,细胞群体可以同时或以任何顺序依次暴露于激活条件和扩增条件。此外,外源多肽可起补充多肽的作用,和/或反之亦然。

[0019] 相对于天然的免疫细胞的组合物(例如生物液体和组织),通过本文提供的方法获得的免疫细胞组合物富含作为天然免疫细胞的NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。在自然界中,发现作为适应性免疫细胞的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的量比NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞高得多。另一方面,在本文提供的组合物中, $\alpha$ . $\beta$ T细胞不存在或以可忽略至很低的量存在,而NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是主要的免疫细胞成分。

[0020] 取决于扩增条件,通过本文提供的方法获得的富含先天免疫细胞的组合物可以包含相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞不同量的NK细胞。在某些非限制性实例中:(i)当补充多肽是IL-2时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(ii)当补充多肽是IL-15时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约80-99%的NK细胞和约1-20%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(iii)当补充多肽是IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体(例如OKT3)时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(iv)当补充多肽为IL-2直到扩增条件的第20天,然后转换为IL-15直到第30天时,与单独使用IL-2的处理相比, $\gamma$ . $\delta$ T细胞的百分比通常从约50%增加到约70%,通常伴随着NK细胞的百分比的相应降低;和(v)当补充多肽为IL-15直到扩增条件的第20天,然后转换为IL-2直到第30天时,与单独使用IL-15的处理相比,NK细胞的百分比通常从约80%增加到约90%,通常伴随有 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的百分比的相应降低。

[0021] 在本文提供的方法的某些方面,样品或去除细胞群体不暴露于选择NK细胞或 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的条件。在一些方面,样品或去除细胞群体不暴露于去除除 $\alpha$ - $\beta$ T细胞以外的细胞的条件。

[0022] 通过本文提供的方法制备的组合物细胞可以进一步被遗传修饰以表达外源多核苷酸,例如肿瘤坏死因子受体、嵌合抗原受体(CAR)、髓样分化初级反应蛋白或先天免疫信号转导适配体。还可以修饰细胞以突变一种或多种多肽或缺失一种或多种多肽。

[0023] 在本文提供的方法的某些方面,可以对包含 $\gamma$ . $\delta$ 细胞和NK细胞的组合物进行处理,从而获得由或基本上由NK细胞或 $\gamma$ . $\delta$ 细胞组成的组合物。治疗可以是去除,例如,通过使用抗CD3抗体去除所有 $\gamma$ . $\delta$ (CD3+)细胞来获得NK细胞,也可以是阳性选择,例如,使用抗CD3抗体选择 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。在一些方面,抗CD3抗体,例如OKT3抗体,可以结合至固相。

[0024] 在本文提供的方法的方面,激活条件、扩增条件或激活条件和扩增条件包括将样品或去除细胞群体在无饲养细胞的培养基中孵育约1小时、2小时、5小时、10小时、12小时、15小时、20小时,或数天,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、45、50、55或60天或更多天,或数周,例如约2、3、4、5、6、7、8、9或10周。在某些方面,激活条件持续约1小时、5小时、10小时、12小时、15小时或20小时至约1天、2天、3天、4天、5天、6天或1周的时间。在一些方面,激活条件是进行约12小时、24小时、36小时或2天至约3天、4天、5天、6天或1周,或约2天至约4天或5天,或约3天至约4天的时间段。在某些方面,扩增条件是进行1天、2天、3天、4天、5天、6天或1周的时间段。在某些方面,以连续的周期执行扩增条件,并且每个周期独立地执行约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或1周、2周、3周或更长时间。在一些方面,扩增周期的数目大于一个,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个周期。在某些方面,每个扩增周期是进行约7天。在某些方面,扩增周期的数目为3。

[0025] 在一些方面,富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。在某些方面,在所述扩增条件下在60天后,富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。

[0026] 在某些方面,通过本文提供的方法获得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含80%或更多的先天免疫细胞。在一些方面,约80%至约100%,或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多,至多100%的细胞是先天免疫细胞。

[0027] 在本文提供的方法的一些方面,激活条件、扩增条件或激活条件和扩增条件两者不包括双膦酸盐。示例性的双膦酸盐包括但不限于氯膦酸盐、依替膦酸盐、阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐、唑来膦酸盐(唑来膦酸)、奈立膦酸盐等。

[0028] 在本文提供的方法的某些方面,通过本文提供的方法获得的组合物包含 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,其相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2细胞的相对量可以通过例如以下一者或多者的扩增条件来定制:不存在双膦酸盐,补充多肽的选择,以及样品或去除细胞群体要经历扩增条件的时间段。在某些非限制性实例中,当扩增条件包括IL-2和免疫特异性结合至CD3的多肽(例如,OKT3)时,(i)V. $\delta$ .1细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约75%至约95%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约80%至约90%,和(ii)V. $\delta$ .2细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约10%至约25%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约10%至约15%或20%。在某些方面,当扩增条件包括IL-2(例如,没有IL-15并且没有免疫特异性结合至CD3的多肽)时,(i)V. $\delta$ .1细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约30%至约60%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约35%至约55%,和(ii)V. $\delta$ .2细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约35%至约60%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约40%至约50%或55%。在某些方面,当扩增条件包括IL-15(例如,没有IL-2并且没有免疫特异性结合至CD3的多肽)时,(i)V. $\delta$ .1细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约10%至约30%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约20%至约25%,和(ii)V. $\delta$ .2细胞可以为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约65%至约80%,有时为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约70%至约75%或80%。

[0029] 本文在某些方面提供了包含细胞群体的组合物,其中所述群体包含:多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;并且被去除了 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。在一些方面,所述组合物不含饲养细胞。本文在某些方面还提供了包含细胞群体的组合物,其中所述群体包含:多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;并且被去除了 $\alpha$ . $\beta$ T细胞;并且不含饲养细胞。在某些方面,细胞群体是外周血细胞的经修饰群体。在某些方面,本文提供的组合物包含:(i)约25%至约45%的NK细胞和约55%至

约75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；(ii) 约25%至约30%的NK细胞和约70%至约75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；(iii) 约80%至约99%的NK细胞和约1%至约20%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞；或(iv) 约40%至约45%的NK细胞和约55%至约60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0030] 在某些方面,本文提供的组合物中30%或更多的细胞被激活。在一些方面,群体中约30%至约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的细胞,或群体中至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多,至多100%的细胞。

[0031] 在一些方面,本文提供的组合物包含细胞群体,所述细胞群体包含一种或多种以下激活标志物,以群体中细胞总数的百分比表示:(a) 群体中90%或更多的细胞表达KIR5; (b) 群体中10%或更多的细胞表达SIGLEC-7; (c) 群体中60%或更多的细胞表达KIR3D51; (d) 群体中10%或更多的细胞表达KIR2DL1; (e) 群体中25%或更多的细胞表达NKp30、NKp44和/或NKp46; (f) 群体中35%或更多的细胞表达NKG2D; (g) 群体中90%或更多的细胞表达DNAM1; (h) 群体中85%或更多的细胞表达NTBA; 和(i) 群体中95%或更多的细胞表达CD2。

[0032] 在某些方面,本文提供的组合物包含80%或更多的先天免疫细胞。在一些方面,组合物富含激活的细胞毒性细胞,其是CD56<sup>+</sup>;并且在某些方面,约80%至约100%,或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞是CD56<sup>+</sup>。在一些方面,本文提供的组合物富含激活的细胞毒性细胞,其是CD57<sup>-</sup>。在某些方面,本文提供的组合物富含激活的细胞毒性细胞,其是CD56<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>。在一些方面,约10%至约40%,或至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞是CD16<sup>+</sup>。在某些方面,本文提供的组合物中少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的细胞是CD57<sup>+</sup>。

[0033] 在某些方面,本文提供的组合物基本上不含除NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞以外的细胞。在一些方面,本文提供的组合物包含约或小于5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或更少的NKT细胞和/或约或小于5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或更少的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。在某些方面,组合物中NK细胞的子集是CD16<sup>+</sup>细胞。在一些方面,大多数 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,或大多数NK细胞,或大多数 $\gamma$ . $\delta$ T细胞和NK细胞两者是CD57<sup>-</sup>细胞。

[0034] 在某些方面,本文提供的组合物的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。在一些方面,本文提供的组合物的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞群体包含:(i) 约75%至约95%的V. $\delta$ .1细胞,例如约80%至约90%的V. $\delta$ .1细胞;和约5%至约25%的V. $\delta$ .2细胞,例如约10%至约15%或20%的V. $\delta$ .2细胞;或(ii) 约30%至约60%的V. $\delta$ .1细胞,例如约35%至约55%的V. $\delta$ .1细胞,和约35%至约60%的V. $\delta$ .2细胞,例如约40%至约50%或55%的V. $\delta$ .2细胞;或(iii) 约10%至约30%的V. $\delta$ .1细胞,例如约20%至约25%的V. $\delta$ .1细胞,和约65%至约80%的V. $\delta$ .2细胞,例如约70%至约75%或80%的V. $\delta$ .2细胞。

[0035] 在某些方面,本文提供的组合物中约50%至约99%或更多,或大于或等于约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8<sup>+</sup>。在一些方面,少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD4<sup>+</sup>。在一些方面,少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>。在某些方面,约15%至约30%的所述NK细胞和/或约55%至85%的所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的中的一部分是CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>。

[0036] 在本文提供的组合物的某些方面,所述群体中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞进一步包括遗传修饰,所述遗传修饰包括外源多核苷酸、突变的多核苷酸、缺失的多核苷酸或其组合。在一些方面,遗传修饰包括外源多核苷酸。所述外源多核苷酸有时处于逆转录病毒载体或慢病毒载体中,并且有时候所述外源多核苷酸整合到修饰的细胞群体的一个或多个细胞的基因组中。

[0037] 在某些方面,所述外源多核苷酸可编码外源或异源T细胞受体、肿瘤坏死因子受体、嵌合抗原受体(CAR)、髓样分化初级反应蛋白、先天免疫信号转导适配体或其他目的蛋白质或多肽,并且在一些方面,可以包括基因表达的启动子或其他调节物。在一些方面,所述外源多核苷酸是调节序列,例如启动子或增强子。

[0038] 在某些方面,所述外源多核苷酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且组合物中的细胞包含CAR。CAR是提供抗原结合和T细胞激活功能的重组受体(参见例如Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388-398(2013))。当工程改造(遗传修饰)免疫细胞(例如T细胞)以表达CAR时,它为免疫细胞提供靶向目的蛋白质或抗原的新的和/或改进的能力。在某些方面,目的靶蛋白质或抗原可以是癌抗原或传染病抗原,其中一些是本领域已知和/或可鉴定的。在一些方面,CAR包含免疫特异性结合至以下一者或多者的结合分子部分:CD19(参见例如GenBank登录号AH005421.2)、GD2(双唾液酸神经节苷脂;参见例如Schulz等人,Cancer Res.,44(12):5914-5920(1984))、HER3(参见例如GenBank登录号M34309.1)、B7H3(参见例如GenBank登录号BC062581.1)、CD123(参见例如GenBank登录号BC035407.1;BX296563.3)或CD30(参见例如GenBank登录号M83554.1;AY498860.1)。

[0039] 可以进一步处理本文提供的任何组合物以去除 $\gamma$ . $\delta$ T细胞或NK细胞,从而产生包含基本上全部NK细胞或基本上全部 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的组合物。例如,可以用抗CD3抗体处理本文提供的组合物,以从NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的混合物中去除 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,留下包含基本上全部或全部NK细胞的组合物,或者,抗CD3抗体可以用于从混合物中分离出基本上纯的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的群体。

[0040] 在某些方面提供了细胞的治疗组合物(或治疗组合),其包含:多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞( $\gamma$

δ);多个自然杀伤细胞(NK);或γδ和NK细胞的组合。在某些方面,对γδ和/或NK细胞进行重组工程改造或遗传修饰,其中,任选地,对γδ和/或NK细胞进行重组工程改造或遗传修饰以在细胞外表达外源或异源蛋白质,并且任选地,外源、异源或嵌合蛋白质是嵌合抗原受体(CAR)或外源或异源T细胞受体(TCR),并且任选地,外源、异源或嵌合蛋白质或CAR对癌细胞或肿瘤标志物或被感染细胞具有特异性(可以与其特异性结合),或外源、异源或嵌合蛋白质或CAR对可以特异性靶向并结合癌细胞或肿瘤标志物或被感染细胞或任何疾病相关抗原的抗体具有特异性(可以与其特异性结合)。

[0041] 在一些方面,γδ和/或NK细胞是人类细胞或动物细胞。在某些方面,将治疗组合物(或治疗组合)配制成用于静脉内(IV)、鞘内、肌内(IM)、腹膜内(IP)或胸膜内(IT)施用、关节腔内施用,或在癌症或感染的部位处或附近注射或植入,或配制成单位剂型,其中任选地,单位剂量包括约 $10^2$ 至 $10^{12}$ 个细胞。

[0042] 或肌内(IM)施用,或配制成单位剂型,其中任选地,单位剂量包括约 $10^2$ 至 $10^{12}$ 个细胞。

[0043] 在一些方面,γδ和/或NK细胞是从体内来源分离的。在一些方面,γδ和/或NK细胞在培养中扩增或从体内来源分离并在培养中扩增。在某些方面,γδ和/或NK细胞从体内来源分离并不使用任何饲养细胞或不使用饲养细胞层的情况下在培养中扩增,从而产生无饲养细胞的γδ和/或NK细胞的扩增群体。在一些方面,γδ和/或NK细胞从体内来源分离并使用饲养细胞或饲养细胞层在培养中扩增,其中任选地,所述饲养细胞被基本上去除和/或杀死以产生基本上无饲养细胞的γδ和/或NK细胞的扩增群体。

[0044] 在某些方面,γδ和/或NK细胞的体内来源来自自体来源(任选地,来自将成为γδ和/或NK细胞的接受者的个体),或外源、异源或同种异体来源。

[0045] 在某些方面,本文还提供了包含本文提供的任何组合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0046] 在某些方面,本文提供了通过向本文提供的组合物中添加外源多核苷酸,使本文提供的组合物中的一个或多个细胞中的多核苷酸突变,或缺失本文提供的组合物中的一个或多个细胞中的多核苷酸来制备遗传修饰的免疫细胞的方法。在一些方面,遗传修饰是外源多核苷酸。用于制造本文提供的组合物通常导致细胞具有高激活状态,其促进例如通过逆转录病毒或慢病毒转导引入外源多核苷酸。在某些方面,制备本文提供的遗传修饰的免疫细胞的方法通常生成其中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞包括遗传修饰的组合物。

[0047] 在某些方面,本文提供了试剂盒,其包含本文提供的任何组合物或药物组合物,任选地还包含使用说明书和任选地细胞因子。本文提供的组合物、药物组合物或试剂盒可以按需要在冷藏温度(例如10摄氏度或更低,例如9、8、7、6、5、4、3、2、1至负4摄氏度或更低)或冷冻温度(例如,负15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85度或更低)下储存以



用于储存和/或运输。在某些方面,试剂盒包含约 $1 \times 10^5$ 个细胞至约 $1 \times 10^{12}$ 个细胞,例如约 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 或 $1 \times 10^{10}$ 个细胞。在某些方面,本文提供的试剂盒可包括细胞因子。在某些方面,细胞因子选自以下一者或多者:TNF(参见例如GenBank登录号KJ892290.1;AY214167.1)、IFN $\gamma$ (参见例如GenBank登录号J00219.1)、白细胞介素IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10(参见例如GenBank登录号U16720.1)、IL-12(对于IL-12A,参见例如GenBank登录号AF404773.1;对于IL-12B,参见例如GenBank登录号AF512686.1)、IL-15、IL-18(参见例如GenBank登录号BC007461.1;BC007007.1)、IL-21、CCL4(参见例如GenBank登录号CR542119.1;KJ901727.1;KJ901726.1)、RANTES(参见例如GenBank登录号GQ504011.1)和TGF $\beta$ (参见例如美国国家生物技术信息中心(NCBI)登录号NM\_000660.7)。在某些方面,试剂盒以单位剂型包含本文提供的组合物或药物组合物。

[0048] 在某些方面,提供了用于实践本文提供的方法的制造产品和试剂盒,包括本文提供的细胞的治疗性组合。在某些方面,制造产品和试剂盒还包括用于实践本文提供的方法的说明书。在一些方面,制造产品和试剂盒还包括能够特异性结合癌症相关或肿瘤相关、感染相关或疾病相关抗原的抗体。本文提供的制造产品可包括植入物,所述植入物包含本文提供的细胞的治疗性组合。

[0049] 在某些方面,本文还提供了通过以可有效治疗癌症或感染的量向有需要的受试者施用本文提供的组合物、药物组合物或试剂盒中的任一者来治疗癌症或感染的方法。可以在自体环境或同种异体环境中施用治疗。在一些方面,产生组合物、药物组合物或试剂盒的样品的供体是治疗的接受者。在某些方面,治疗可以在两个或更多个分开的日子施用,并且在某些方面,治疗可以以多剂量施用。在某些方面,治疗以约1单位剂量至约36或更多单位剂量、以约2周至约4周的时间间隔施用。在一些方面,治疗以单一单位剂量每天一次、两次、三次、四次或至多五次施用,或在几天、几周或几个月的时间内施用一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,或隔日一次施用,或者一周施用一次、两次、三次、四次、五次或六次。治疗可以按每千克受试者体重约 $10^4$ 至约 $10^{10}$ 个细胞的单位剂量,或每名受试者约 $10^6$ 至约 $10^{12}$ 个细胞的单位剂量静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)、腹膜内(IP)、胸膜内、关节腔内施用,或在癌症或感染的部位处或附近注射或植入。在某些方面,单位剂量是每名受试者约 $10^{10}$ 个细胞,或每千克受试者体重约 $10^8$ 个细胞。

[0050] 在本文提供的治疗方法的某些方面,治疗是针对癌症的。在一些方面,癌症选自肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病或淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或儿童急性淋巴母细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、肥大细胞瘤或肥大细胞肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、乳腺肿瘤、结肠直肠癌、白血病、淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)或急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、组织细胞肉瘤、脑肿瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经瘤、结肠癌、宫颈癌、肉瘤、膀胱肿瘤、网状内皮组织肿瘤、威尔姆氏瘤、骨癌、骨肉瘤、肾癌或头颈癌、口腔癌、喉癌、转移性疾病或口咽癌。

[0051] 在本文提供的治疗方法的某些方面,将第二药剂与所述组合物、药物组合物或试剂盒共同施用。在一些方面,第二药剂是与癌症相关抗原免疫特异性结合的抗体。在某些方面,癌症相关抗原选自由以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐

酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM-5)、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子 (FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- $\beta$ 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、PD1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PIGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、生存素 (survivin)、生存素-2B、TAC、TAG-72、肌腱蛋白、TRAIL受体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6和Kras。

[0052] 在某些方面,本文提供的组合物的细胞可以被工程改造以表达与癌症相关抗原结合的抗体。在一些方面,抗体作为第二药剂共同施用。在某些方面,癌症相关抗原选自hR1 (抗IGF-1R)、hPAM4 (抗粘蛋白)、KC4 (抗粘蛋白)、hA20 (抗CD20)、hA19 (抗CD19)、hIMMU31 (抗AFP)、hLL1 (抗CD74)、hLL2 (抗CD22)、抗CD19/CD22双特异性抗体、RFB4 (抗CD22)、hMu-9 (抗CSAp)、hL243 (抗HLA-DR)、hMN-14 (抗CEACAM-5)、hMN-15 (抗CEACAM-6)、hRS7 (抗TROP-2)、hMN-3 (抗CEACAM-6)、CC49 (抗TAG-72)、J591 (抗PSMA)、D2/B (抗PSMA)、G250 (抗碳酸酐酶IX)、迪妥昔单抗 (dinutuximab) (抗GD2)、英夫利昔单抗 (infliximab) (抗TNF- $\alpha$ )、赛妥珠单抗聚乙二醇 (certolizumab pegol) (抗TNF- $\alpha$ )、阿达木单抗 (adalimumab) (抗TNF- $\alpha$ )、阿仑单抗 (alemtuzumab) (抗CD52)、贝伐单抗 (bevacizumab) (抗VEGF)、西妥昔单抗 (cetuximab) (抗EGFR)、吉妥单抗 (gemtuzumab) (抗CD33)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (抗CD20)、帕尼单抗 (panitumumab) (抗EGFR)、利妥昔单抗 (rituximab) (抗CD20)、托西莫单抗 (tositumomab) (抗CD20)、GA101 (抗CD20)、曲妥珠单抗 (trastuzumab) (抗HER2/neu)、托珠单抗 (tocilizumab) (抗IL-6受体)、巴利昔单抗 (basiliximab) (抗CD25)、达克珠单抗 (daclizumab) (抗CD25)、依法珠单抗 (efalizumab) (抗CD11a)、莫罗单抗 (muromonab) -CD3 (抗CD3受体)、那他珠单抗 (natalizumab) (抗 $\alpha$ 4整联蛋白)、BWA-3 (抗组蛋白H2A/H4)、LG2-1 (抗组蛋白H3)、MRA12 (抗组蛋白H1)、PR1-1 (抗组蛋白H2B)、LG11-2 (抗组蛋白H2B) 和LG2-2 (抗组蛋白H2B)。

[0053] 在本文提供的治疗方法的某些方面,治疗是针对感染的。在一些方面,感染是通过细菌、真菌、病毒或原生动植物病原体的存在来表征的。在本文提供的治疗方法的某些方面,感染选自由以下组成的组:疱疹、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、牛痘病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、甲型肝炎病毒 (HAV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、疱疹病毒 (例如HSV-1、

HSV-2、HHV-6、CMV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口腔炎病毒(VSV)、杆菌(Bacilli)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、霍乱(Cholera)、白喉(Diphtheria)、肠杆菌(Enterobacter)、淋球菌(Gonococci)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、克雷伯菌属(Klebsiella)、军团菌属(Legionella)、脑膜炎球菌(Meningococci)、分枝杆菌(mycobacteria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、肺炎球菌(Pneumonococci)、立克次氏菌(rickettsia bacteria)、沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)、葡萄球菌属(Staphylococci)、链球菌属(Streptococci)、破伤风(Tetanus)、曲霉属(Aspergillus)(烟曲霉(A.fumigatus)、黑曲霉(A.niger)等)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、念珠菌属(Candida)(白色念珠菌(C.albicans)、克鲁斯念珠菌(C.krusei)、光滑念珠菌(C.glabrata)、热带念珠菌(C.tropicalis)等)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、毛霉菌属(Genus Mucorales)(毛霉菌(mucor)、犁头霉(absidia)、根霉(rhizopus))、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenkii)、巴西芽生菌(Paracoccidioides brasiliensis)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、钩端螺旋体病(Leptospirosis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、蠕虫寄生虫(helminth parasite)(钩虫(hookworm)、绦虫(tapeworms)、吸虫(flukes)、扁虫(flatworms)(例如血吸虫病(Schistosomia))、蓝氏贾第虫(Giardia lamblia)、旋毛虫(trichinella)、脆弱双核阿米巴(Dientamoeba Fragilis)、布氏锥虫(Trypanosoma brucei)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)或杜氏利什曼虫(Leishmania donovani)。

[0054] 在一些方面,本文提供了治疗癌症、肿瘤、功能失调细胞或被感染细胞的方法,其包括:(a)向有需要的个体施用治疗有效量的本文所述的细胞的治疗组合物,或(b)(i)提供或已经提供本文所述的细胞的治疗组合物;和(ii)将治疗有效量的细胞的治疗组合物施用或已经施用于有需要的个体。

[0055] 在本文提供的治疗方法的某些方面,有需要的个体是人或动物。在一些方面, $\gamma\delta$ 和/或NK细胞是从体内来源分离的,并且任选地, $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的所述体内来源来自同基因或自体来源(任选地,来自将成为所述 $\gamma\delta$ 和/或NK细胞的接受者的个体),或外源、异源或同种异体来源,或其组合。在本文提供的方法的一些方面,细胞的治疗组合物或组合通过静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)施用,或者被注射或植入癌细胞、肿瘤细胞、功能障碍细胞或被感染细胞中或附近(邻近),并且任选地,细胞的治疗组合物以植入物或凝胶的形式递送,其中任选地,所述凝胶是水凝胶。

[0056] 在本文提供的治疗方法的一些方面,细胞的治疗组合物或组合以单位剂型施用,其中任选地,单位剂量包括约 $10^2$ 至 $10^{12}$ 个细胞或 $10^4$ 至 $10^{10}$ 个细胞;或每日剂量包括约 $10^2$ 至 $10^{12}$ 个细胞或 $10^4$ 至 $10^{10}$ 个细胞。在某些方面,细胞的治疗组合物或组合或单位剂型在几天、几周或几个月的过程中向所述有需要的个体施用几次(多次)或两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,并且任选地,多个单位剂型中的每一个被每天一次、每隔一天一次、每周2、3、4、5或6次、或每周一次地施用。

[0057] 在本文提供的治疗方法的某些方面,需要治疗的个体首先通过向所述有需要的个体预先给药针对癌症相关或肿瘤相关、感染相关或疾病相关抗原的未结合抗体,随后施用本文所述的细胞的治疗组合物,被诱导起始针对癌症、感染或疾病的免疫反应,其中所述细胞的治疗组合物中的至少一些在其细胞表面上表达与所述未结合抗体特异性结合的多肽,

任选地是CAR。在一些方面,向所述有需要的个体施用能够特异性结合癌症相关或肿瘤相关、感染相关或疾病相关抗原的抗体,随后施用本文描述的细胞的治疗组合物,其中所述细胞的治疗组合物中的至少一些在其细胞表面上表达与所述抗体特异性结合的多肽,任选地是CAR,并且任选地,在施用所述细胞的治疗组合物之前、期间或之后施用所述抗体。

[0058] 本技术的某些实施方案的细节阐述于附图和以下描述中。根据该描述和附图且根据权利要求书,本技术的其他特征、目标和优势将显而易见。

[0059] 本文引用的所有公开、专利、专利申请都以引用的方式明确并入本文中以用于所有目的。

## 附图说明

[0060] 附图示出了本技术的某些实施方案,并且不是限制性的。为了清楚和便于说明,附图未按比例绘制,并且在一些情况下,可夸大或放大地示出各个方面以便于理解特定实施方案。

[0061] 图1显示了 $\alpha\beta$ TCRneg单核细胞的扩增与细胞被抗体激活并在无饲养层的培养条件下扩增的天数的关系,如在培养的第10天所分析的。

[0062] 图2显示了激活的扩增 $\alpha\beta$ TCRneg单核细胞群体(在本文中称为INNATE-K或BINATE细胞群体)的组成的分析。

[0063] 图3显示了在无饲养层地培养扩增的激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞的第10天样品中, $\gamma\delta$ TCR+细胞上T细胞谱系标志物CD4(辅助细胞)和CD8(细胞毒性)的频率和分布,如通过流式细胞术所分析的。

[0064] 图4显示了在10天内CAR.19INNATE-K细胞的扩增速率的分析。

[0065] 图5显示了共培养物细胞毒性分析的数据,其中INNATE-K细胞和INNATE-CAR.19细胞与CD19+白血病(221)或CD19+淋巴瘤(Daudi)细胞系共培养。

[0066] 图6显示了在长时间体外培养中平板中扩增的INNATE-NK细胞群体的总数。

[0067] 图7显示了平板与生物反应器扩增的INNATE-NK群体的总细胞数的比较。

[0068] 图8显示了在体外INNATE-NK扩增的不同时间点期间的子集细胞组成。

[0069] 图9显示了在长时间的体外培养期间INNATE-NK CAR细胞中的嵌合抗原受体(CAR)分子表达。

[0070] 图10显示了INNATE-NK和INNATE-NK CAR群体扩增后激活和细胞溶解分子的表达。

[0071] 图11显示了无饲养层地扩增的INNATE-NK细胞和INNATE-NK CAR细胞中缺少耗尽。

[0072] 图12显示了INNATE-NK或INNATE-NK-CAR.19和4种肿瘤细胞系的细胞毒性共培养测定:A行:221,一种CD19+白血病细胞系;B行:Daudi,一种CD19+淋巴瘤细胞系;C行:BV173,一种CD19+(可变表达)pre-B肿瘤细胞系;和D行:KARPAS,一种CD19-肿瘤细胞系。

[0073] 图13和14显示了对于INNATE-NK细胞和INNATE-NK-CAR.19细胞群体,在不同的测试运行中原发性肿瘤细胞的特异性溶解百分率作为效应物(E)与靶标(T)的比率的函数。

[0074] 图15显示了与效应细胞(INNATE-NK细胞和INNATE-NK-CAR.19细胞群体)共培养后,与在没有效应细胞的情况下接种原代CD19+白血病母细胞的对照条件相比,残留原代CD19+肿瘤的百分比。

[0075] 图16显示了接受INNATE-NK和INNATE-NK-CAR.19细胞的动物的存活曲线。

[0076] 图17显示了总BINATE扩增,其通过随时间变化的总细胞数表示(即,在烧瓶中补充有IL-2或IL-15的BINATE培养基中的激活的 $\alpha$ BTCR neg细胞扩增,以及在生物反应器中的激活的 $\alpha$ BTCRneg细胞群体的IL-15扩增)。

[0077] 图18显示了总BINATE扩增,其通过随时间变化的总细胞数表示(即,在烧瓶中补充有IL-2、IL-15、IL-2/OKT3、IL-2/IL-15或IL-2/IL-15/OKT3的BINATE培养基中的激活的 $\alpha$ BTCRneg细胞扩增)。

[0078] 图19显示了针对IL-15扩增条件,通过标志物类型(激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度)进行的表型分析。

[0079] 图20显示了针对IL-2扩增条件,通过标志物类型(激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度)进行的表型分析。

[0080] 图21显示了针对IL-2/OKT3扩增条件,通过标志物类型(激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度)进行的表型分析。

[0081] 图22显示了大约每7天针对BINATE和BINATE.CARGD2群体记录的细胞数。

[0082] 图23显示了小鼠血液和小鼠肝脏中人BINATE细胞的体内维持。

[0083] 图24显示了流程图,其示出了用于分离纯的NK细胞群体和/或分离纯的 $\gamma$   $\delta$  T (gd) 细胞群体的方法的示例变体。

## 具体实施方式

[0084] 在某些方面,本文提供了治疗性免疫细胞组合物,其中大量的免疫细胞或大多数的免疫细胞是先天免疫细胞。这种组合物可以在施用后在受试者中产生先天免疫反应。先天免疫系统在宿主中是活跃的并持续起作用,反应迅速(在感染后数分钟至数小时内),并以非特异性方式作出反应,从而提供可用作针对更广泛的患者群体的“现成的”免疫疗法的潜力。先天免疫细胞(例如NK细胞和 $\gamma$  .  $\delta$  ( $\gamma$   $\delta$ ) T细胞)不识别经典的HLA抗原,因此可用于现成(同种异体)环境,同时缓解移植物抗宿主疾病(GvHD)。先天免疫细胞可以离体扩增,从而避免了细胞因子释放综合征(CRS)。可以利用先天免疫细胞组合物(其中可以定制组分(例如NK细胞、 $\gamma$  .  $\delta$  ( $\gamma$   $\delta$ ) T细胞)和组分的量)来提供针对多种癌症(包括实体瘤和血液系统癌症)、感染等的协同攻击战线。

[0085] 相反,不是通过本文描述的方法产生的某些免疫细胞组合物包括大多数适应性免疫细胞而不是先天免疫细胞。当利用其中大多数细胞是适应性免疫细胞的免疫细胞组合物时,识别是通过HLA抗原进行的,并且存在显著的GvHD风险,尤其是如果免疫疗法中使用的适应性免疫细胞来自同种异体来源时。因此,在此类组合物中使用的适应性免疫细胞最常来源于患者/受试者(自体)或指定的“匹配”供体,这限制了免疫疗法的全部功能,即以“现成”方式用于广大患者群体的能力。利用此类组合物的大多数细胞疗法是自体的,或者至少是来源于特定供体的。这意味着必须为每个患者单独调整该患者的剂量。因此,当前的基于T细胞的治疗组合物,例如使用嵌合抗原受体(CAR)或外源性T细胞受体(TCR)的细胞疗法(像在 $\alpha$ BT细胞中那样),不能“现成”使用。制造过程可能需要六周或更长时间,在此期间,患者的疾病(例如癌症或感染)可能已经进展。另外,这些患者特异性的制造过程中的一些因为各种原因而失败,不仅包括一般的制造失败,而且还包括由于化学疗法或放射疗法之后患者-供体的免疫系统的衰竭状态而导致的特定失败。此外,体内 $\alpha$ BT细胞(或经CAR修饰的

“CAR-T”细胞)的扩增有时会导致细胞因子大量且快速地释放到血液中,从而导致严重或危及生命的CRS。

[0086] 因此,本文所述的治疗性免疫细胞组合物提供了优于包括大多数适应性免疫细胞的细胞组合物的优势。相对于从自然存在的受试者获得的生物样品,本文所述的治疗性免疫细胞组合物也经过了修饰和改变。下文中将详细描述治疗性免疫细胞组合物、制造方法和治疗用途。

[0087] 制造先天免疫细胞组合物的方法

[0088] 本文提供了制造先天免疫细胞组合物的方法。通过本文提供的方法制造的组合物通常包含两种激活的先天免疫细胞群体的混合物:自然杀伤(NK)细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0089] 相对于自然界(例如生物液体和组织)中的免疫细胞的组成,通过本文提供的方法获得的免疫细胞组合物富含作为天然免疫细胞的NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。在自然界中,发现作为适应性免疫细胞的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的量比NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞高得多。另一方面,在本文提供的组合物中, $\alpha$ . $\beta$ T细胞不存在或以可忽略至很低的量存在,而NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是主要的免疫细胞成分。

[0090] 例如,在人类外周血中,已经发现在健康人类供体的外周血中:(i)对于40岁以下的个体,PBMC中NK细胞的中位数百分比为5%,而T细胞(CD8+和CD4+组合群体,代表 $\alpha$ . $\beta$ T细胞,因为 $\gamma$ . $\delta$ T细胞通常是CD8-CD4-)的中位数百分比为53%;和(ii)对于40岁以上的个体,PBMC中NK细胞的中位数百分比为10%,而T细胞(CD8+和CD4+组合群体)的中位数百分比为37%(Lepone等人,J.Circ.Biomark.,5(5):1-17(2016))。因此,在外周血中,在40岁以上的个体中,对于每1个循环NK细胞,大约几乎有4个循环 $\alpha$ . $\beta$ T细胞,而在40岁以下的个体中,对于每1个循环NK细胞,大约有略超过10个循环 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。因此,循环血液中NK细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率在约1:4至约1:10的范围内。另一方面,在本文提供的组合物中,NK细胞占组合物的20%或更多,最高达99%,而 $\alpha$ . $\beta$ T细胞几乎不存在并且占组合物的少于2%,通常几乎为0%,或少于组合物的0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或0.1%。因此,在本文提供的组合物中,NK细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率为至少10:1,并且通常远高于10:1,例如约或大于15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1、150:1、200:1、250:1、300:1、350:1、400:1、450:1、500:1、550:1、600:1、650:1、700:1、750:1、800:1、850:1、900:1、950:1或1000:1或更高。因此,尽管在自然界中相对于NK细胞而言 $\alpha$ . $\beta$ T细胞占主导地位,但在本文提供的组合物中,NK细胞群体相对于 $\alpha$ . $\beta$ T细胞群体大大增加。

[0091] 关于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,例如在外周血中,少于约10%的T细胞,通常约5%的T细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,而其余的是 $\alpha$ . $\beta$ T细胞(Esin等人,Scand.J.Immunol.,43(5):593-596(1996);Radestad等人,J.Immunol.Res.,Article ID 578741(2014))。因此,循环血液中 $\gamma$ . $\delta$ T细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率在约1:10至约1:20的范围内。另一方面,在本文提供的组合物中, $\gamma$ . $\delta$ T细胞占组合物的1%或更多,通常介于2%或更高至70-75%之间,而 $\alpha$ . $\beta$ T细胞几乎不存在并且占组合物的少于2%,通常几乎为0%,或组合物的少于0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或0.1%。因此,在本文提供的组合物中,即使假设其中 $\gamma$ . $\delta$ T细胞以1%存在且 $\alpha$ . $\beta$ T细胞以2%存在的组合物, $\gamma$ . $\delta$ T细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率也至少为0.5:1。因此,在本文提供的组合物中, $\gamma$ . $\delta$ T细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率要高得多,例如约或大于5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1、150:

1、200:1、250:1、300:1、350:1、400:1、450:1、500:1、550:1、600:1、650:1、700:1或750:1或更高。

[0092] 如本文所用,术语“富含”是指本文提供的组合物中的以下两个比率:(i)  $\gamma$  . $\delta$ T细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率,和(ii)NK细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率高于自然界中(例如生物样品中,例如外周血中)的这些比率。通常,如本文所用,“富含”是指本文提供的组合物中 $\gamma$  . $\delta$ T细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率相对于生物样品(例如组织、脐带血或外周血)中的该比率增加至少5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍或750倍或更高。关于NK细胞,一般来说,如本文所用,“富含”是指本文提供的组合物中NK细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率相对于生物样品(例如组织、脐带血或外周血)中的该比率增加至少40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍或1000倍或更高。在某些方面,术语“富含”是指本文提供的组合物的NK细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率和 $\gamma$  . $\delta$ T细胞与 $\alpha$  . $\beta$ T细胞的比率大于1(该比率在自然界中通常小于1)。

[0093] 在外周血中,作为适应性免疫细胞的B细胞和 $\alpha$  . $\beta$ T细胞构成淋巴细胞的大部分。另一方面,通过本文提供的方法制造的组合物富含先天免疫细胞,即NK细胞和 $\gamma$  . $\delta$ T细胞。术语 $\alpha$  . $\beta$ T细胞和 $\alpha$  $\beta$ T细胞在本文中可互换使用,是指适应性免疫T细胞,而术语 $\gamma$  . $\delta$ T细胞和 $\gamma$   $\delta$ T细胞在本文中可互换使用,是指先天免疫T细胞。

[0094] 出于多种原因,由先天免疫细胞构成的用于免疫疗法的组合物优于包含适应性免疫细胞的组合物。先天免疫反应是非特异性的,并且在感染后数分钟至数小时内针对目的靶标(例如,癌症或传染病)启动。先天免疫细胞可以离体扩增。在本文提供的方法中,扩增条件可导致在扩增后长达60天内不会耗尽NK细胞和 $\gamma$  . $\delta$ T细胞的组合物,这允许了长期储存(适于现成保存和在必要时重新施用)和节省成本地施用多个剂量的能力。另一方面,适应性免疫细胞启动抗原特异性免疫反应,并在体内与靶抗原结合时扩增,这可能需要几天甚至几周的时间。此外,与先天免疫性不同,适应性免疫反应依赖于HLA抗原,这要求细胞是自体的或与接受者患者/受试者“相匹配”,以最小化或避免GvHD(移植物抗宿主疾病)。通过本文提供的方法制备的组合物中包含先天免疫细胞(例如NK细胞和 $\gamma$  . $\delta$ ( $\gamma$   $\delta$ ) T细胞)的组合物不需要HLA抗原识别即可介导杀伤,并因此可以用于更广泛的现成(同种异体)环境,同时缓解GvHD。适应性免疫细胞在体内扩增时还会产生大量细胞因子,这可能导致细胞因子释放综合征(CRS);先天免疫细胞可以离体扩增,从而最小化或避免CRS。

[0095] 在本文提供的方法中,从受试者获得包含细胞的样品,例如外周血或脐带血。受试者通常是健康的供体,但也可以是需要用通过本文提供的方法制备的免疫疗法组合物治疗的患者。在某些方面,当样品是外周血时,外周血通用供体库可以用作样品来源。样品有时会经历激活条件,包括使样品与以下多肽接触:(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至不同于所述细胞粘附多肽的多肽并在样品群体的一个或多个细胞的表面上表达的外源多肽。细胞粘附多肽的实例包括但不限于CD2(参见例如GenBank登录号KJ905161.1;KJ896558.1)、LFA-1(参见例如GenBank登录号BC005861.2)、LFA-3(参见例如GenBank登录号BC005930.1)、CD8(关于CD8A,参见例如

GenBank登录号AH003215.2;AY039664.1;关于CD8B,参见例如GenBank登录号KJ896562.1;BC100911.1;BC100912.2;BC100913.1;BC100914.1)和CD4(参见例如GenBank登录号M35160.1;DQ892052.2)。在样品群体的一个或多个细胞(例如NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ 细胞)的表面上表达的多肽的实例包括但不限于CD2(参见例如GenBank登录号KJ905161.1;KJ896558.1)、CD3(关于CD3 $\gamma$ ,参见例如GenBank登录号AB583162.1;关于CD3 $\epsilon$ ,参见例如GenBank登录号AB583139.1;关于CD3 $\delta$ ,参见例如GenBank登录号AH002612.2)、CD56(参见例如GenBank登录号U63041.1;BC047244.1;BC029119.1)、NKp30(参见例如GenBank登录号AB055881.1)、NKp44(参见例如GenBank登录号BC166647.1)、NKp46(参见例如GenBank登录号BC064806.1;AY346373.1)、NKG2A(参见例如GenBank登录号AF461812.1;BC053840.1)、PD-1(参见例如GenBank登录号L27440.1)、NKG2C(参见例如GenBank登录号BC093644.1;BC112039.1)、NKG2D(参见例如GenBank登录号AF461811.1;BC039836.1)、KAR受体、KIR受体、SIGLEC-7(参见例如GenBank登录号AF193441.1;AF170485.1)、KIR3DS1(参见例如GenBank登录号EU156175.1)、KIR2DL1(参见例如GenBank登录号LT984790.1;LT984791.1;抗体:11PB6)、DNAM1(参见例如GenBank登录号BC074787.2;U56102.1)、NTBA(参见例如GenBank登录号BC114495.1;BC113893.1)、HLA-DR(关于 $\alpha$ ,参见例如GenBank登录号AH001506.2;关于 $\beta$ ,参见例如AH002824.2)等。细胞的激活通常在本文提供的组合物的细胞中启动先天免疫反应,其可用于靶向需要治疗疾病的受试者的此类疾病,例如癌症或传染病。

[0096] 如果多肽相对于替代性表位更频繁地,更迅速地,以更长的持续时间和/或以更大的亲和力与另一分子的区域(即表位)反应或缔合,则该多肽免疫特异性地结合该表位。例如,与第一表位免疫特异性结合的多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)是与其结合第二表位或其他表位相比,以更大的亲和力、亲合力、更容易和/或以更长的持续时间结合该第一表位的抗体。与第一靶标免疫特异性结合的多肽可以或不特异性地或优先地结合第二靶标,并且免疫特异性结合不一定是排他性结合。

[0097] 在本文提供的方法的某些方面,激活条件包括使样品与至少两种外源多肽接触。在一些方面,第一外源多肽免疫特异性结合至CD2,并且第二外源多肽免疫特异性结合至NKp46。在一些方面,激活条件由或基本上由免疫特异性结合至CD2的第一外源多肽和免疫特异性结合至NKp46的第二外源多肽组成。如本文中所使用的,短语“基本上由……组成”是指除了所列举的组分以外的组分(如果存在的话)不会实质性地改变所列举的组分的活性。因此,例如,在上述激活条件的背景下,激活条件可以包括一种或多种除了与CD2免疫特异性结合的第一外源多肽和与NKp46免疫特异性结合的第二外源多肽以外的组分,所述组分不会实质性地改变第一外源多肽和第二外源多肽的活性。在某些方面,所述第一外源多肽和/或所述第二外源多肽是抗体或其抗原结合片段。

[0098] 还通常使样品经历扩增条件,包括使所述样品与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的群体的组合物。在本文提供的方法的某些方面,扩增条件包括至少一种补充多肽,所述补充多肽是细胞因子和/或与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽。在某些方面,细胞因子是白细胞介素,例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21或其任何组合。在本文提供的方法的一些方面,细胞因子是IL-2、IL-15或其组合。在一些方面,扩增条件包括、由或基本上由IL-2、IL-15和与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性



结合的多肽组成。在某些方面， $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体是CD3。在一些方面，与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的CD3受体免疫特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段，并且在某些方面，所述抗体是OKT3。在某些方面，扩增条件包括、由或基本上由使样品与以下多肽接触组成：(a) IL-2多肽；(b) IL-15多肽；(c) IL-2多肽和IL-15多肽；(d) IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体；或(e) IL-2多肽、IL-15多肽和免疫特异性结合CD3的抗体。在一些方面，免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

[0099] 在一些方面，激活条件由或基本上由使样品与免疫特异性结合至CD2的第一外源多肽和免疫特异性结合至NKp46的第二外源多肽接触组成，并且扩增条件由或基本上由使样品与以下多肽接触组成：(a) IL-2多肽；(b) IL-15多肽；(c) IL-2多肽和IL-15多肽；(d) IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体；或(e) IL-2多肽、IL-15多肽和免疫特异性结合CD3的抗体。在一些方面，免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

[0100] 在某些方面，本文提供的用于制造组合物的方法包括在激活和扩增之前从样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞，从而产生去除细胞群体，其然后可以经历激活和扩增。例如，可以使用与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞受体例如 $\alpha$ . $\beta$ TCR免疫特异性结合的抗体从样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。如本文所用，术语“去除”是指基本上所有的被去除组分（例如， $\alpha$ . $\beta$ T细胞）已从样品中去除，例如，至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或更高、至多约100%的被去除组分已从样品中去除。通常，如本文所用，术语“去除细胞群体”是指在从样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞之后来源于样品的细胞群体。在某些方面，使用例如与B细胞受体例如CD19免疫特异性结合的多肽另外去除样品中的B细胞。

[0101] 例如，当样品是外周血样品时，可以通过密度梯度离心法处理样品，以分开和/或分离出含有白细胞、血小板、粒细胞等的血沉棕黄层，然后可以根据本文提供的方法对其进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。在某些方面，血沉棕黄层可以进一步经历Ficoll梯度分离以获得单核细胞(PBMC)，然后可以在本文提供的方法中对其进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。在一些方面，外周血样品可以经历单采血液成分法以将细胞与血浆分离（例如使用Terumo Optia机器），并且在某些方面，然后可以在本文提供的方法中对细胞进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除可以通过本领域技术人员已知的方法进行。在某些方面，可以使用Miltenyi Ls柱去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。在一些方面，可以使用Miltenyi Clinimacs分离装置对单采血液成分法产物进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除。如果需要或希望的话，可以将去除细胞群体冷冻保存（例如，在负70、75、80、85或更低的摄氏度下），并在激活和扩增之前储存。用于激活和扩增的培养条件的非限制性实例包括本文实施例部分中针对含有NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ 细胞描述的激活和扩增条件，或补充有5%AB血清的NK MACS™培养基(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))，或本领域使用的其他培养基（例如R&D Systems, CellGenix）。

[0102] 在某些方面，在本文所述的激活和扩增条件之前，细胞群体不暴露于阳性选择NK细胞或阳性选择 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的条件下。

[0103] 在本文提供的方法的某些方面，使样品或去除细胞群体经受激活条件，其中(a)中的外源多肽、(b)中的外源多肽或(a)中的外源多肽和(b)中的外源多肽两者都是可溶的。在一些方面，(a)中的可溶性外源多肽、(b)中的可溶性外源多肽或(a)和(b)两者中的可溶性外源多肽是抗体或其抗原结合片段。如本文所用的关于组分例如多肽的术语“可溶的”是指该组分不结合至固相或载体，并且在培养条件下（例如，激活条件、扩增条件）是均匀单相或

乳液。在一些方面, (a) 或 (b) 中的外源多肽, 例如抗体, 结合至固相或载体。固体载体的实例包括但不限于二氧化硅、玻璃(例如玻璃、可控多孔玻璃(CPG))、尼龙、王树脂、Merrifield树脂、Sephadex(葡聚糖凝胶)、Sephacrose(琼脂糖凝胶)、纤维素、磁珠、Dynabeads、金属表面(例如钢、金、银、铝、硅和铜)、塑料材料(例如聚乙烯、聚丙烯、聚酰胺、聚酯、聚双氟乙烯(PVDF))。固体载体可以是任何期望的形式, 包括但不限于: 珠子、芯片、毛细管、板、膜、晶片、梳子、针、基本平坦的表面、凹坑或纳升孔的阵列, 以及本领域技术人员已知的其他几何形状和形式。使用可溶性外源多肽而不是结合至固体载体的多肽可以减少空间位阻, 同时增加(例如, 用于GMP制造的) 方法的可扩展性。在某些方面, 第一外源多肽是可溶性的抗CD2抗体, 而第二多肽是可溶性的抗NKp46抗体。在某些方面, 抗CD2抗体或抗NKp46抗体结合至固体载体。

[0104] 可以使用标准方法制备抗体, 例如多克隆抗体和单克隆抗体(参见例如Kohler等人, *Nature* 256:495-497 (1975); Kohler等人, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976); 和WO 02/46455)。例如, 为了产生多克隆抗体, 在宿主动物中引起针对目的抗原的免疫反应。然后使用本领域技术人员已知的方法收集来自宿主动物的血液, 并从细胞级分中分离出含有分泌的抗体的血清级分。为了产生单克隆抗体, 通过标准方法对动物进行免疫以产生分泌抗体的体细胞。然后将这些细胞从经免疫的动物中取出以与骨髓瘤细胞融合。可以产生抗体的体细胞, 特别是B细胞, 可用于与骨髓瘤细胞系融合。这些体细胞可以来源于初免动物的淋巴结、脾脏和外周血。已经从淋巴细胞性肿瘤中开发出了专门的骨髓瘤细胞系, 用于产生杂交瘤的融合程序中(Kohler和Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976); Shulman等人, *Nature*, 276:269-282 (1978); Volk等人, *J. Virol.*, 42:220-227 (1982))。这些细胞系具有三个有用的特性。第一个特性是它们具有酶缺陷, 使它们无法在支持杂交瘤生长的选择性培养基中生长, 从而有助于从未融合的且类似地无限期自我繁殖的骨髓瘤细胞中选择融合杂交瘤。第二个特性是它们具有产生抗体的能力, 并且不能产生内源性免疫球蛋白轻链或重链。第三个特性是它们可以有效地与其他细胞融合。用于产生杂交瘤和单克隆抗体的其他方法是本领域技术人员众所周知的。其对于产生针对任何多肽(例如免疫细胞群体上的抗原标志物)的抗体是常规的。

[0105] 在本文提供的方法的某些方面, 激活条件、扩增条件或激活条件和扩增条件两者不含饲养细胞。如本文所用, 术语“不含”(例如, 不含多个饲养细胞或不含饲养细胞、不含血清、不含来自非人类动物的血清、不含被耗尽的细胞)是指条件基本上不含(即, 至少80%、85%、90%、95%, 通常95%或更高, 例如96%、97%、98%、99%或更高, 至多100%不含)该组分(即, 饲养细胞、血清、被耗尽的细胞或本文提到的其他组分)。在本文提供的方法的某些方面, 样品、激活条件、扩增条件或激活条件和扩增条件或所有前述各者均不含外源细胞、不含外源饲养细胞、不含被辐射细胞和/或不含被辐射的饲养细胞。外源细胞和外源饲养细胞通常是来自不同受试者的细胞, 或来自受试者的不同部分的细胞, 与自其获得样品细胞并经历激活条件和/或扩增条件的受试者或受试者部分相比。在非限制性实例中, (i) 样品细胞来自第一物种的受试者, 并且外源细胞来自第二物种的受试者(例如, 样品细胞来自人, 并且外源细胞来自非人类动物, 例如啮齿动物或猴), 以及(ii) 样品细胞来自人类受试者的外周血, 并且外源细胞来自同一受试者的不同部分(例如来自同一受试者的脐带血或器官, 或来自不同的人类受试者)。当样品在以下一个或全部过程期间未与某种组分接触

时,组合物通常“不含”该组分:在激活和/或扩增之前的处理、激活和扩增。

[0106] 对饲养细胞(例如K562细胞或其他细胞)的依赖会限制细胞的培养地点和培养方式,并且可以显著增加细胞培养成本。由于来源于饲养细胞的不确定的生物学因素引起的细胞培养变异性,饲养细胞的使用也可能会出现。另外,饲养细胞具有将不需要的试剂(例如,逆转录病毒、其他病原体和免疫原性非人唾液酸,例如Neu5Gc)引入通过本文提供的方法制备的组合物中的可能,这对于某些应用例如例如移植可能是不合需要的。不受理论的束缚,在本文提供的方法中,免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽可产生“内源性饲养细胞样层”,从而产生显著激活的扩增细胞群体而无需外源性饲养细胞。

[0107] 在本文提供的方法的某些方面,可以根据NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的所需相对量来定制一种或多种补充多肽的选择和/或扩增条件下的扩增时间。例如,含有相对较多的NK细胞和相对较少的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的组合物通常对实体瘤具有更大的适用性,而含有相对较多的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞和相对较少的NK细胞的组合物通常对血液系统恶性肿瘤具有更大的适用性。可以选择一种或多种补充多肽,和/或可以进行扩增反应一段时间,以促进获得具有NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的期望比例的组合物。可以通过选择特定的扩增条件获得NK细胞相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的期望比例,并且组合的非限制性实例如下:(i)当补充多肽是IL-2时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(ii)当补充多肽是IL-15时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约80-99%的NK细胞和约1-20%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(iii)当补充多肽是IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体(例如OKT3)时,所得的富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体通常包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;(iv)当补充多肽为IL-2直到扩增条件的第20天,然后转换为IL-15直到第30天时,与单独使用IL-2的处理相比, $\gamma$ . $\delta$ T细胞的百分比通常从约50%增加到约70%,伴随着NK细胞的百分比的相应降低;和(v)当补充多肽为IL-15直到扩增条件的第20天,然后转换为IL-2直到第30天时,与单独使用IL-15的处理相比,NK细胞的百分比通常从约80%增加到约90%,伴随有 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的百分比的相应降低。

[0108] 扩增条件的持续时间(例如12天对比25天)也可以控制通过本文提供的方法制备的组合物中NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的相对量。例如,样品或去除细胞群体在扩增条件下在无饲养细胞的培养基中的孵育时长可以是约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、45、50、55或60天或更长时间,或约2、3、4、5、6、7、8、9或10周。在本文提供的方法的某些方面,组合物不含耗尽细胞,并且在一些方面,在至少60天的扩增条件后,组合物不含耗尽细胞。由于增加了扩增的细胞毒性细胞组合物的离体可用性,因此制备基本不含耗尽细胞的细胞组合物允许立即进行治疗和多次给药,而成本仅为许多当前免疫疗法(例如,使用 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的CAR-T)的一小部分。

[0109] 在本文提供的方法的某些方面,激活条件或扩增条件或激活条件和扩增条件不包括双磷酸盐,生成V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的多克隆群体。使用双磷酸盐,例如唑来膦酸盐和帕米膦酸盐可能比另一种克隆群体更有利于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的某种克隆群体,这会限制组合物针对某些肿瘤和感染的全部功能。在一些方面,本文提供的方法中不存在双磷酸盐会产生关于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞呈多克隆的组合物,从而增加了它们可以作为免疫疗法施用的癌症和传染病的范围。

[0110] 执行本文提供的方法的步骤概述的非限制性实例如下:

[0111] (1) 如有需要,将来自供体的样品(例如,直接来自供体或血库的外周血)融解,并置于培养中;(2) 如果需要,对培养物进行 $\alpha$ . $\beta$ T细胞去除和任选的B细胞去除;(3) 使样品或去除后的剩余细胞(去除细胞群体)经历激活条件3-4天,产生激活的细胞;(4) 如果需要,使用例如逆转录病毒载体或慢病毒载体用外源多核苷酸转导激活的细胞;(5) 在(3)中激活或在(4)中转导之后,使细胞以7天的周期经历扩增条件,在各周期之间洗涤,通常持续2-3个周期,从而产生扩增的细胞,其有时立即使用或在其他时间冷藏,保持在冰上或冷冻保存,以供运输和/或储存,直到需要进行免疫治疗为止。NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比例可以通过选择扩增过程中使用的一种或多种补充多肽(包括在需要的情况下在7天的周期之间切换补充多肽)以及控制扩增时间来调节。

[0112] 在某些方面,由暴露于激活和扩增条件的样品细胞群体产生的组合物具有以下特征:

[0113] (i) NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率大于1(例如,比率为约1.5或更大、2或更大、3或更大、4或更大或5或更大;比率为约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100或更大);或者

[0114] (ii) NK细胞与 $\gamma$ - $\delta$ T细胞的比率小于1(例如,比率为约0.8或更小、0.7或更小、0.6或更小、0.5或更小、0.1或更小、0.05或更小、0.01或更小;比率为约0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.001或更小);

[0115] 并且任选地具有以下一项或多项特征:

[0116] (iii) NK细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更大;

[0117] (iv)  $\gamma$ - $\delta$ T细胞与 $\alpha$ . $\beta$ T细胞的比率大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更大;

[0118] (v) NK细胞相对于总细胞的百分比为20%或更大;

[0119] (vi)  $\gamma$ . $\delta$ T细胞相对于总细胞的百分比为2%、3%、4%、5%或更大;

[0120] (vii) 约75%至约95%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约80%至约90%(例如,约85%)的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达V. $\delta$ .1;

[0121] (viii) 约10%至约25%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约10%至约20%(例如,约15%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞))表达V. $\delta$ .2;

[0122] (ix) 约30%至约60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(约35%至约55%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达V. $\delta$ .1;

[0123] (x) 约35%至约60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约40%至约50%或55%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达V. $\delta$ .2;

[0124] (xi) 约10%至约30%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约20%至约25%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达V. $\delta$ .1;

[0125] (xii) 约65%至约80%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约70%至约80%(例如,约75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞))表达V. $\delta$ .2;

[0126] (xiii) 约80%或更多的总细胞(例如,约90%或更多的细胞)表达KIR5;

- [0127] (xiv) 约5%或更多的总细胞(例如约10%或更多的细胞)表达SIGLEC-7;
- [0128] (xv) 约50%或更多的总细胞(例如,约60%或更多的细胞)表达KIR3D51;
- [0129] (xvi) 约5%或更多的总细胞(例如,约10%或更多的细胞)表达KIR2DL1;
- [0130] (xvii) 约20%或更多的总细胞(例如,约25%或更多的细胞)表达NKp30、NKp44或NKp46;
- [0131] (xviii) 约25%或更多的总细胞(例如,35%或更多的细胞)表达NKG2D;
- [0132] (xix) 约80%或更多的总细胞(例如约90%或更多的细胞)表达DNAM1;
- [0133] (xx) 约75%或更多的总细胞(例如,约85%或更多的细胞)表达NTBA;
- [0134] (xxi) 约85%或更多的总细胞(例如,约95%或更多的细胞)表达CD2;
- [0135] (xxii) 约80%至约100%的总细胞(例如,至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞)表达CD56;
- [0136] (xxiii) 约51%至约100%的总细胞(例如,至少约51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞)不表达CD57;
- [0137] (xxiv) 约10%至约40%的总细胞(例如,至少约11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞)表达CD16;
- [0138] (xxv) 约10%或更少的总细胞(例如,约5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少的细胞)表达CD57;
- [0139] (xxvi) 约50%或更多的总细胞(例如,约55%或更多的细胞)表达KIR3DS1;
- [0140] (xxvii) 约5%或更少的总细胞(例如,约4%或更少、3%或更少、2%或更少、1%或更少、0.9%或更少、0.8%或更少、0.7%或更少、0.6%或更少、0.5%或更少、0.4%或更少、0.3%或更少、0.2%或更少、0.1%或更少)是NKT细胞;
- [0141] (xxviii) 约5%或更少的总细胞(例如,约4%或更少、3%或更少、2%或更少、1%或更少、0.9%或更少、0.8%或更少、0.7%或更少、0.6%或更少、0.5%或更少、0.4%或更少、0.3%或更少、0.2%或更少、0.1%或更少)是 $\alpha$ . $\beta$ T细胞;
- [0142] (xxix) 约50%或更多的NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ 细胞(例如,约51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达CD8;
- [0143] (xxx) 约5%或更少的NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ 细胞(例如,约4%或更少、约3%或更少、约2%或更少或约1%或更少的NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达CD4;
- [0144] (xxxix) 约5%或更少的NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ 细胞(例如,约4%或更少、约3%或更少、约2%或更少或约1%或更少的NK细胞和/或 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)表达CD8和CD4;

[0145] (xxxii) 约15%至约35%的NK细胞(例如16%、17%、18%、19%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%的NK细胞)不表达CD8和CD4;和

[0146] (xxxiii) 约55%至约85%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞(例如,约56%、58%、60%、62%、63%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞)不表达CD8或CD4。

[0147] 先天免疫细胞组合物

[0148] 通过本文所述的制造方法制备的某些组合物被称为BINATE组合物。BINATE组合物含有两种先天细胞类型,即NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞,并且可以通过选择合适的一种或多种补充多肽(包括其使用顺序)和扩增条件的持续时间来调节这两种细胞类型的相对量,以治疗实体瘤、血液癌症或传染病。

[0149] 在一些方面,BINATE组合物不包含饲养细胞,并且通常这些组合物不含饲养细胞(例如,不含外源饲养细胞和/或辐射的饲养细胞)。在某些方面,激活和扩增条件不包括双膦酸盐,从而使多克隆 $\gamma$ . $\delta$ T细胞具有更广范围的针对肿瘤和传染病的活性库(即,关于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是多克隆的)。这种先天免疫细胞平台在本文中可互换地称为BINATE细胞、INNATE细胞或INNATE-K细胞,可以全面参与肿瘤信号和受体,并为实体瘤、血液癌和感染提供容易获得的通用疗法。安全性提高的先天性免疫疗法可以允许在社区医院使用,从而降低医疗成本并为更多患者带来有效的治疗。

[0150] 在某些方面,使用肯定选择目的细胞群体或消除不需要的细胞群体的标志物,可以进一步处理本文提供的BINATE细胞组合物,以产生包含基本上所有NK细胞(本文称为“INNATE-NK”)或基本上所有 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的组合物。

[0151] 本文提供的BINATE组合物可开发为:a)移植后或其他环境/适应症中的未基因修饰的细胞;b)与其他治疗剂(例如,可商购的用于癌症治疗的抗体)组合给药的未基因修饰的细胞;或c)遗传修饰的细胞,例如通过突变内源多核苷酸、通过缺失内源多核苷酸或通过添加外源突变多核苷酸(其中野生型形式存在于未修饰的细胞中)或添加异源的外源多核苷酸,例如,用于靶向实体瘤和血液系统恶性肿瘤两者的CAR多核苷酸(BINATE.CAR)。经CAR修饰的INNATE-K(与BINATE相同)或INNATE-NK群体在本文中用以下任何术语命名:

[0152] 通常,对于通过CAR修饰的免疫细胞,以“CAR”后缀指所述细胞,并在所述后缀之前加上句点或连字符,例如INNATE-CAR、INNATE-K.CAR、INNATE-NK.CAR或BINATE.CAR;和

[0153] 对于通过特定CAR(例如,靶向CD19的CAR)修饰的免疫细胞,以“CD19”、“CAR19”或“CAR.CD19”后缀互换地指所述细胞,并在所述后缀之前加上句点或连字符,例如BINATE.CD19、BINATE.CAR19或BINATE.CAR.CD19。

[0154] 本文提供的制造方法产生具有高激活水平的BINATE细胞群体,所述高激活水平为群体中约30%至约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的细胞,或所述群体中至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多,至多100%的细胞。相比之下,触发体内先天免疫反应导致10%或更少的细胞被激活。

[0155] 这些激活的细胞是高度细胞毒性的,具有显著比例的CD56+CD16+细胞(例如,本文提供的组合物中NK细胞群体的约40%可以是CD56+CD16+)。如本文所用,与细胞上的细胞标志物的描述有关的“+”符号或单词“阳性”表示该标志物在细胞中(或在细胞表面上)表达,而与细胞上的细胞标志物的描述有关的“-”符号或单词“阴性”表示该标志物不存在或未检测到。

[0156] 尽管本文提供的组合物的BINATE细胞的细胞毒性高,但是它们的成熟度低(即,它们离衰老更远),因为大多数细胞的CD57标志物水平低(CD57标志物水平高表示细胞毒性,但也表示细胞更接近衰老,因此寿命更短(参见Kared等人,Cancer Immunol.Immunotherap.,65(4):441-452(2016))。如本文所用,术语“大多数”是指所述群体中大于50%,通常50.5%或更多,例如51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞。通过本文提供的制备方法制备的BINATE细胞组合物还具有低水平的耗尽标志物,例如PD-1和TIM-3。下面总结了根据本文提供的制造方法在不同扩增条件下获得的BINATE组合物的激活/细胞毒性/耗尽标志物表型的非限制性实例:

[0157]

	NK 细胞			TCRgd (γδ T) 细胞		
	IL-2	IL-2+OKT3	IL-15	IL-2	IL-2+OKT3	IL-15
扩增条件						
%NK 或 γδ T 细胞	27.25%	42.50%	98.75%	72.27%	56.61%	1.23%
标志物						
CD16	51.21	65.17	40.88	18.64	29.12	28.87
KIR	98.47	96.25	93.37	96.43	92.18	100
NKG2A	98.43	94.09	99.04	94.81	97.06	93.81
LIR-1	34.54	49.14	10.14	64.02	50.41	19.59
CD57	54.99	41.96	2.46	69.14	46.23	35.05
NKG2C	13.46	23.76	2.18	3.46	2.67	12.37
p75 (间接 APC-Cy7) 抑制剂						
SIGLEC-7	72.81	22.85	97.42	6.19	1.97	56.19
KIR3DS1-激活剂	57.03	68.08	69.11	62.4	65.4	69.3
KIR3DL1 (直接 FITC) 抑制剂	11.7	13.24	22.62	3.99	2.99	18.52
KIR2DL1 (直接 APC) 激活剂	38.11	47.73	10.14	27.41	37.1	15.79
11PB6 (直接 Viob) KIR2DL1-inh						
KIR2DS1-act	24.83	38.73	7.43	9.22	4.35	20.37
CH-LEO (间接 APC-Cy7) KIR2DL2						
KIR2DL3 KIR2DS2	37.94	57.38	35.25	23.96	60.13	25.44
AZ20 (间接 PE) NKP30	83.62	78.52	99.9	10.37	7.6	54.17
BAB281 (间接 PE) NKP46	84.45	77.7	99.86	12.96	11.72	19.48
z231 (间接 PE) NKP44	67.01	60.14	99.58	19.74	6.25	78.35
ECM217 (间接 APC-Cy7) NKG2D	34.42	48.67	62.13	40.26	54.08	86.46
GN18 (间接 FITC) DNAMI	90.54	95.66	94.38	96.68	99.77	96.91
ST39 (间接 FITC) D24	99.19	96.3	99.76	97.26	98.17	96.88
ON56 (间接 APC-Cy7) NTBA	95.06	75.94	98.47	99.75	95.84	98.7
EA4 (间接 FITC) LSF1	99.53	95.56	94.34	99.08	99.55	98.7



[0158]

TIGIT (间接 APC-Cy7)	26.71	28.21	18.96	19.26	25.07	15.31
D1.12 (间接 FITC) HLA-DR	68.42	66.16	6.25	97.16	97.67	52.04
TIM-3 (间接 APC)	0.37	0.31	0.14	0.58	0.61	5.1
QA196 (间接 APC) CD2	99.82	99.72	98.53	99.08	100	100
CD8 (间接 APC-Cy7)	58.16	68.02	91.17	45.98	74.48	97.94

[0159] 在某些方面,本文提供的BINATE组合物的细胞可以被遗传修饰。遗传修饰的某些非限制性实例包括 (i) 添加编码具有期望活性的多肽的外源多核苷酸, (ii) 改变或添加内

源多核苷酸,或添加外源调节性多核苷酸(例如,引物或增强子),其调节具有期望活性的内源多肽的表达;(iii)改变和/或破坏编码具有期望活性的多肽的内源多核苷酸(例如,插入诱变),(iv)部分或完全缺失调节具有期望活性的多肽的调节性多核苷酸,从而破坏其调节,和/或(v)部分或完全缺失编码具有期望活性的多肽的编码序列,从而减弱或消除活性(例如,敲除诱变)。

[0160] 在一些方面,通过添加外源(调节或编码序列)多核苷酸对BINATE组合物进行遗传修饰。BINATE组合物的高度激活的细胞可以在高效率下被转导,所述群体中通常80%或更高,通常至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞被转导。该转导率远高于通常在适应性免疫细胞中发现的转导率(例如,在 $\alpha$ . $\beta$ T细胞中约为9%)。

[0161] 在某些方面,外源多核苷酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且组合物中的细胞包含CAR(称为“BINATE.CAR细胞”)。在一些方面,CAR含有与CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123或CD30中的一者或多者免疫特异性结合的结合分子部分。

[0162] 本文提供的BINATE细胞和BINATE.CAR细胞可用于靶向多种癌症和传染病(例如, GD2/HER3/B7H3:肺/支气管、前列腺、乳腺、结肠、胰腺、卵巢;CD123:白血病;CD30:非霍奇金淋巴瘤;其他癌症,包括肝和肝内胆管、食道、膀胱、肾脏和肾盂、子宫、脑/神经系统)。还发现GD2(一种双唾液酸神经节苷脂)也在神经外胚层起源的肿瘤细胞的表面上表达。具有GD2表达的肿瘤具有很高的死亡率(小儿肿瘤-神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、肉瘤;成人肿瘤-黑色素瘤、非小细胞肿瘤、乳腺肿瘤)。由于神经性疼痛的毒性,目前正在作为疗法测试的单克隆抗体具有局限性。使用BINATE.CAR.GD2构建体进行的初步研究表明,NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞两者中的转导水平同等高(NK细胞中约为80%, $\gamma$ . $\delta$ T细胞中约为40-60%);表达在BINATE培养期间是稳定的并得以保持。另外,观察到实体瘤细胞的体外杀伤(实施例18)。

[0163] 药物组合物和试剂盒

[0164] 本文提供的任何组合物都可以与药学上可接受的载体一起配制成药物组合物。像所述组合物一样,本文提供的药物组合物可用于治疗癌症和传染病。本文还提供了包含本文提供的组合物或药物组合物以及任选的使用说明的试剂盒。在某些方面,本文提供的试剂盒可包括细胞因子。先天免疫细胞控制多种病毒、真菌、细菌和寄生虫病原体的机会性入侵,部分是通过释放过多的细胞因子和趋化因子与其他细胞进行通讯,从而协调免疫反应。

[0165] 药物组合物或试剂盒有时包括治疗细胞的特定剂量,并且有时药物组合物或试剂盒提供治疗细胞的单位剂量。在某些方面,单位剂量为预期受试者每千克体重约 $10^4$ 至约 $10^{10}$ 个细胞,或每名受试者约 $10^6$ 至约 $10^{12}$ 个细胞(例如,每名受试者约 $10^{10}$ 个细胞,或预期受试者每千克体重约 $10^8$ 个细胞)。

[0166] 药物组合物或试剂盒可包括药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的监管机构批准,或在美国药典或其他公认药典中被列出以供用于动物,尤其是人类。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全和不完

全)、赋形剂或运载体。当组合物要通过输注施用,可以用装有无菌药物级水或生理盐水的输液瓶分配。在通过注射施用组合物的情况下,可以提供无菌注射用水或生理盐水的安瓿,以便可以在施用之前将成分混合。

[0167] 有时将药物组合物作为药物包装或试剂盒提供,其包括一个或多个容器,所述容器用通过本文所述的方法制备的治疗性细胞组合物单独填充或与这种药学上可接受的载体一起填充。另外,可用于治疗疾病的一种或多种其他预防剂或治疗剂也可包括在药物包装或试剂盒中。药物包装或试剂盒可包括一个或多个装有本文所述的药物组合物的一种或多种成分的容器。任选地,与此类容器相关联的可以是通知,其采取由管理药品或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,所述通知反映了人类给药的制造、使用或销售机构的认可。药物包装或试剂盒有时在一个或多个容器中包括可用于治疗疾病的一种或多种其他预防剂和/或治疗剂。

[0168] 当细胞在作为免疫疗法施用之前离体扩增时,有时细胞自身无法产生足够量的细胞因子。可以任选地添加到本文提供的试剂盒中的细胞因子包括但不限于TNF、IFN $\gamma$ 、白细胞介素IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、CCL4/RANTES和TGF $\beta$ 。在某些方面,本文提供的药物组合物和/或试剂盒任选地包括用于与本文提供的组合物共同施用的第二药剂。如本文所用,词语“共同施用”、“共施用”、“共同给药”等是指在在本文提供的先天细胞组合物之前、之后或同时施用药剂。

[0169] 在一些方面,第二药剂是靶向癌细胞抗原或感染性病原体的抗体。本文提供的组合物、药物组合物和试剂盒可以视情况保持在负4摄氏度或更低,或大约负75摄氏度至大约负80摄氏度,以便储存或运输。

[0170] 制备遗传修饰的先天细胞组合物的方法

[0171] 可以以合适的方式(例如,通过添加作为基因或调节序列的外源多核苷酸,通过突变内源基因或通过缺失内源基因)对本文提供的先天细胞组合物进行遗传修饰。遗传修饰可以在获得最终组合物之后,在激活和扩增之后进行,或者可以在激活之后并在细胞经历扩增之前进行。下文描述了进行各种遗传修饰的方法的非限制性实例:

[0172] (a) CRISPR-CAS9靶向抑制(永久基因/基因座缺失)

[0173] 可以用同时表达CAS9蛋白质和特异于目的基因的向导RNA(gRNA)的DNA质粒转染细胞。可以使用供体DNA质粒修复gRNA-CAS9介导的基因组切割,这会导致目标基因的特异性缺失以及基因编码的蛋白质的永久和完全丧失。可以使用PCR(DNA水平)、Northern印迹/FISH(RNA水平)或任何蛋白质测定法(例如Western印迹或流式细胞术)来验证蛋白质表达的损失。

[0174] (b) CRISPR-CAS9靶向表达(永久基因/基因座插入)

[0175] 该方法可用于将目的基因插入细胞基因组的特定位置。可以用同时表达CAS9蛋白质和特异于特定插入位置的向导RNA(gRNA)的DNA质粒转染细胞。可以使用供体DNA质粒修复gRNA-CAS9介导的基因组切割,所述供体DNA质粒具有插入的目的基因,所述目的基因的侧翼为DNA切割/双链断裂位置的两侧的细胞基因组的序列,从而引起目的基因在特定基因组位置的同源重组介导的插入,而不是随机插入。可以使用PCR(DNA水平)、Northern印迹/FISH(RNA水平)或任何合适的蛋白质测定法(例如Western印迹或流式细胞术)来验证成功的插入和蛋白质表达。

[0176] (c) 通过逆转录病毒/慢病毒/转座子介导的shRNA/微小RNA转导进行RNA干扰(永久基因抑制)

[0177] 可以设计靶向目的特定基因/蛋白质的shRNA/microRNA,并将其克隆到逆转录病毒/慢病毒/转座子载体中,以稳定整合到细胞基因组中。可以用载体转导细胞,并且可以使用载体编码的选择标志物选择成功转导的细胞。可以使用例如Northern印迹和蛋白质测定法来评估shRNA介导的目的基因的抑制。

[0178] (d) 慢病毒/ $\gamma$ -逆转录病毒介导的随机/多拷贝基因插入

[0179] 可以设计目的特定基因/蛋白质,和/或将其克隆到逆转录病毒或慢病毒载体中,以稳定地随机整合到细胞基因组中。可以用病毒载体转导细胞,并且可以使用载体编码的选择标志物选择成功转导的细胞。可以使用Northern印迹和任何合适的蛋白质测定法(例如Western印迹、流式细胞术等)评估shRNA介导的目的基因的抑制。

[0180] (e) 转座子介导的随机/多拷贝基因插入

[0181] 可以设计目的特定基因/蛋白质,和/或将其克隆到哺乳动物的转座子载体系统中,例如PiggyBac(SBI System Biosciences)或等效物。可以用转座子载体和转座酶载体共转染细胞,所述转座子载体具有侧翼为反向末端重复(ITR)序列的目的基因(cDNA)。转座酶可以介导目的基因转移到TTAA染色体整合位点中。可以任选地使用载体编码的选择标志物来选择成功转导的细胞。可以使用PCR(DNA水平)、Northern印迹/FISH(RNA水平)或任何合适的蛋白质测定法(例如Western印迹或流式细胞术)来验证成功的插入和蛋白质表达。

[0182] (f) 直接转染

[0183] 可以将编码目的基因/蛋白质的mRNA直接转染到细胞中。可以使用任何已建立的方法进行转染,例如:氯化钙转染;脂质体转染;Xfect;电穿孔;声致穿孔和细胞挤压(例如,为了引入siRNA)。

[0184] 治疗方法

[0185] 本文还提供了通过以有效治疗癌症或感染的量向有需要的受试者施用本文提供的组合物、药物组合物或试剂盒中的任一者来治疗癌症或感染的方法。可以在自体环境或同种异体环境中施用治疗。产生组合物、药物组合物或试剂盒的样品的供体可以是治疗的接受者。通常,组合物、药物组合物或试剂盒是由来自一名受试者的样品制备的,并且将治疗施用于不同的受试者。在某些方面,治疗可以在两个或更多个分开的日子施用,并且在某些方面,治疗可以以多剂量施用。在某些方面,治疗以约1单位剂量至约36或更多单位剂量和约2周至约4周的时间间隔施用。在一些方面,治疗以单一单位剂量每天一次、两次、三次、四次或至多五次,或在几天、几周或几个月的时间内一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,或隔日一次,或者一周一次、两次、三次、四次、五次或六次施用。治疗可以按每千克受试者体重约 $10^4$ 至约 $10^{10}$ 个细胞的单位剂量,或每名受试者约 $10^6$ 至约 $10^{12}$ 个细胞的单位剂量静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)、腹膜内(IP)、胸膜内、关节腔内施用,或在癌症或感染的部位处或附近注射或植入。在某些方面,单位剂量是每名受试者约 $10^{10}$ 细胞,或每千克受试者体重约 $10^8$ 个细胞。

[0186] 在本文提供的治疗方法的某些方面,治疗是针对癌症的。在一些方面,癌症是实体瘤。在一些方面,癌症是血液学癌症。在某些方面,癌症是血液学癌症,并且 $\gamma$ . $\delta$ T细胞与NK细胞的比率大于1。在一些方面,癌症是实体瘤,并且NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率大于1。在本

文提供的治疗方法的某些方面,将第二药剂与所述组合物、药物组合物或试剂盒共同施用。在一些方面,第二药剂是与癌症相关抗原免疫特异性结合的抗体。

[0187] 在本文提供的治疗方法的某些方面,治疗是针对感染的。在一些方面,感染是通过细菌、真菌、病毒或原生动植物病原体的存在来表征的。

[0188] 在本文提供的方法的某些方面,组合物、药物组合物或试剂盒包含 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的多克隆群体(例如,关于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是多克隆的)。

[0189] 将参考本文所述的实施例进一步描述本技术;然而,应理解本技术不受限于此类实施例。

[0190] 实施例

[0191] 以下阐述的实施例说明了某些实施方案,并且不限制本技术。

[0192] 在以下所述的某些方法(例如,激活条件、扩增条件、表型分析)中使用了以下材料:

[0193] 在Ospedale Pediatrico Bambino Gesù(OPBG)的“儿科肿瘤细胞和基因疗法(Cell and Gene Therapy for Pediatric Tumor)”实验室中产生了以下单克隆抗体(mAb):

[0194] c218(IgG1,抗CD56)、c127(IgG1,抗CD16)、AZ20和F252(分别是IgG1和IgM,抗NKp30)、BAB281和KL247(分别是IgG1和IgM,抗NKp46)、Z231(IgG1,抗NKp44)、ECM217和BAT221(分别是IgG2b和IgG1,抗NKG2D)、KRA236、GN18和F5(分别是IgG1、IgG3和IgM,抗DNAM-1)、EA4(IgG2a,抗CD18)、MAR206、MA258和QA196(分别是IgG1、IgG2b和IgM,抗CD2)、MA127和ON56(分别是IgG1和IgG2b,抗NTB-A)、PP35、ST39和CO54(分别是IgG1、IgG1a和IgM,抗2B4)、z27(IgG1,抗KIR3DL1/S1)、AZ158(IgG2a,抗KIR3DL1/L2/S1)、z270、z199和Y9(分别是IgG1、IgG2b和IgM,抗NKG2A)、6A4和A6/136(分别是IgG1和IgM,抗HLA-I类)、D1/12(IgG2a,抗HLA-DR)、5A10(IgG1,抗PVR)、L14(IgG2a,抗结合素-2)、BAM195(IgG1,抗MICA)。

[0195] F278(IgG1,抗CD85j)mAb由意大利热那亚的Istituto Giannina Gaslini的Daniela Pende博士友情提供(另请参见,例如Costa等人,Aids,15:965-974(2001))。抗NKG2C(IgG2b,134522克隆)、抗ULBP-1(IgG2a,170818克隆)、抗ULBP-2(IgG2a,165903克隆)、抗ULBP-3(IgG2a,166510克隆)、抗CD34-APC(IgG1,QBEnd10克隆)、IgG-APC同型对照(IgG1克隆11711)和抗KIR2DL1-FITC或非偶联(IgG1,143211克隆)mAb购自R&D System Inc(Abingdon,United Kingdom(英国))。抗KIR2DL/S1-Vioblue或-PE(IgG1,11PB6克隆)、抗NKG2C-ViobrightFITC(REA205克隆)、抗KIR3DL1-生物素或-FITC(IgG1,DX9克隆)、抗CD3-Viogreen(IgG2a,BW264/56克隆)、抗CD57-Vioblue(IgM,TB03克隆)、抗SIGLEC-7-Vioblue(REA214克隆)、抗NKp30-PE(IgG1,AF29-4D12克隆)、抗NKp46-PE(IgG1,9E2克隆)、抗NKp44-PE(IgG1,2.29克隆)、抗生物素-PerCPVio700(REA746克隆)、REA对照VioBright FITC(克隆REA293)、抗PD-1(IgG2b,PD1.3.1.3克隆)mAb购自Miltenyi Biotec(Bergisch Gladbach,德国)。抗CD34(IgG1,QBEnd10克隆)、抗NKG2A-PC7(z199克隆)、抗KIR3DL1/S1-PE(z27克隆)、抗KIR2DL2/L3/S2-PE(GL183克隆)、抗CD19-FITC(IgG1,J3-119克隆)、抗CD56-PC7(IgG1,N901克隆)、IgG1-PC7或-PE或-FITC同型对照(679.1Mc7克隆)mAb购自Beckman Coulter,Immunotech(Marseille,法国)。抗KIR2DL2/L3-S2-FITC或非偶联(IgG2b,CHL克隆)、抗CD107-PE(IgG1,H4A3克隆)、抗CD85j(IgG2b,GHI/75克隆)、抗CD16-PerCpCy5.5

(IgG1,3G8克隆)、抗CD56-BV510 (IgG2b,NCAM16.2克隆)、IgG1-PE同型对照(克隆MOPC-21) mAb和Brillant染色缓冲液是从BD Bioscience Pharmingen (San Diego,CA) 获得。抗HLA-Bw6-FITC和抗HLA-Bw4-FITC mAb购自ONE LAMBDA INC (Canoga Park,CA)。抗人HLA-E (IgG1, 3D12克隆) 和抗人HLA-G (IgG1, MEM-G/9克隆) mAb分别购自BioLegend (San Diego,CA) 和 Abnova (中国台湾,台北)。抗NKG2D (IgG2a,5C6克隆) 和抗HLA-C (IgG1,C-8克隆) 购自Santa Cruz Biotechnology (Dallas,Texas,USA)。

[0196] 对于扩增条件,IL-2、IL-15和OKT3是从Miltenyi Biotec (San Diego,CA,USA) 获得,如同交联的或与珠子结合的抗CD2和抗NKp46抗体。

[0197] 实施例1:从 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体中富集和扩增先天溶细胞性免疫细胞 (INNATE-K) 的特定群体

[0198] 该实施例描述了一种富集和扩增特定的先天溶细胞性免疫细胞群体(本文称为INNATE-K或BINATE细胞群体)的方法,所述细胞群体主要由来自起始 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体的NK和 $\gamma\delta$ TCR+T细胞组成(为了分析该扩增的T细胞群体的组成,请参见图2;术语INNATE-K和BINATE在本文中可以互换使用,并且是指本文所讨论的被NCR抗体(例如抗NKp46)与LFA抗体(例如抗CD2)的组合激活并包含NK细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的混合物的细胞群体),处于无饲养层的培养条件,用针对一种或多种免疫球蛋白超家族表面分子的抗体激活:

[0199] 1.对已经用G-CSF动员的正常健康供体进行大规模白细胞分离术;或者,在不动员的情况下对正常健康供体进行大规模白细胞分离术,或使用血沉棕黄层。

[0200] 2.使用SEPA<sup>TM</sup>装置 (Sepax Technologies, Inc., Newark DE) 进行Ficoll<sup>TM</sup>梯度细胞分离,以去除红细胞、血小板和粒细胞,留下单核细胞悬浮液;进行Ficoll<sup>TM</sup>梯度分离的替代性方法包括MILTENYI PRODIGY<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 或使用离心机进行手动分离。

[0201] 3.按照制造商的说明,使用临床规模的MILTENYI CLINIMACS<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec, San Diego, Ca) 对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除,或进行研究规模的Miltenyi LS柱分离。

[0202] 4.将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体置于无饲养层的培养条件下,并遵循制造商的说明,通过抗CD2和抗NKp46珠子 (NK Cell Activation/Expansion Kit<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)) 和500IU/mL人白细胞介素2 (IL-2) (Miltenyi Biotec) 激活。

[0203] 5.在无饲养层的培养条件下,在24孔板中以 $0.25 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度,用补充有5% AB血清和500IU/mL人白细胞介素2 (IL-2) 的NK MACS<sup>TM</sup>培养基 (#130-107-879 (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)) 将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增,然后转移至T75烧瓶中;替代的培养容器可以包括生物反应器 (G-Rex<sup>TM</sup>25ml, Wilson Wolf Manufacturing, St. Paul MN)。

[0204] 6.大约每3天用新鲜培养基和新鲜IL-2按#5中所述的浓度进行培养基更换,并以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的浓度接种细胞。在该方法的某些变型中,培养基更换大约每4天进行一次。当接种到生物反应器中时,培养基更换可能大约每6或7天发生一次,直到达到目标剂量为止。

[0205] 7.在扩增开始后的任何时间,可以分别对不想要的群体分别进行CD3+去除或CD56+去除,从而使所得的富集的特定先天免疫溶细胞性群体 (NK和 $\gamma\delta$ TCR+T细胞) 针对纯的NK或 $\gamma\delta$ TCR+T细胞进一步富集,以获得纯的细胞群体,并按照步骤5#进一步培养。

[0206] 8. 扩增结束时,将INNATE-K细胞冷冻保存在含有10%DMSO溶液的无血清冷冻介质(CryoStor™,BioLife Solutions,Bothell WA)中。

[0207] 图1示出了 $\alpha\beta$ TCRneg细胞的扩增作为细胞被抗体激活并在无饲养层的培养条件下扩增的天数的函数,如在培养的第10天所分析的。该图显示,细胞在1周左右开始达到对数扩增,并持续扩增,产生了大量适合成功进行现成疗法的细胞。在图1中,激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞在无饲养层的培养条件下进行培养扩增。显示了截至扩增当天的培养物的总细胞数,在培养的第6天后观察到扩增的显著增加。

[0208] 图2显示了NK细胞为70%并且 $\gamma\delta$ TCR+ T(GD)细胞为28%;该比例适合于治疗产品;随着细胞的进一步扩增,可能会发生变化;在没有饲养细胞培养且不受其他细胞污染的情况下,大量获得了这两种细胞类型。图2示出了在制造方法的以下实施例中的各个步骤中,特定先天免疫溶细胞性细胞(INNATE-K)、NK和 $\gamma\delta$ TCR+ T细胞以及CD3+CD56+ NKT细胞和适应性免疫 $\alpha\beta$ TCR+T细胞的富集和表型。

[0209] a) Ficoll梯度分离后单核级分中的细胞频率为8%+12%NK细胞和0.1%+1% $\gamma\delta$ TCR+T细胞、6%CD3+CD56+NKT细胞和73% $\alpha\beta$ TCR+T细胞;

[0210] b)  $\alpha\beta$ TCR+T细胞去除步骤后的细胞频率为25%+15%NK细胞和3.2%+1.2% $\gamma\delta$ TCR+T细胞(其中0.5%CD56-CD3+和2.7%CD56+CD3+)和1%或更少的 $\alpha\beta$ TCR+T细胞。

[0211] c) 激活和无饲养层培养扩增后第10天,NK细胞频率基本上富集至68%+23%,并且 $\gamma\delta$ TCR+T细胞基本上富集至15.7%+5%(其中12.2%CD56-CD3+和3.5%CD56+CD3+)。检测到的CD3+适应性免疫细胞水平可忽略不计: $\alpha\beta$ TCR+T细胞为0.3%+0.5%,而NKT细胞为0.2%+0.3%。

[0212] 在第10天,对共表达CD56(NK)表面抗原、CD16和CD57的细胞进行流式细胞术分析(荧光激活细胞分选仪或FACS分析)。CD16是FC $\gamma$ 受体III,因此可以结合IgG抗体的FC部分并介导抗体结合的靶细胞的抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。CD16在NK细胞介导的自发细胞毒性中起作用。CD56+CD16+子集被认为是最具细胞毒性的子集,并且构成了大多数NK细胞(例如在生理条件下)。CD57可能是NK细胞增殖能力较弱的标志物。在用IL-2刺激或与靶细胞共培养后,NK细胞上CD57的获得与CD56+NK细胞子集的成熟有关。这种差异伴随着功能改变;与CD57-细胞相比,CD57+NK细胞响应于IL-2和IL-15增殖较差,并且响应于IL-12和IL-18产生的IFN- $\gamma$ 较少。对于CD56+NK细胞,37%是CD16+并且63%是CD16-;对于CD56+CD16-细胞,13%是CD57+并且87%是CD57-;以及对于CD56+CD16+细胞,15%是CD57+并且85%是CD57-。流式细胞术表型结果表明,细胞组合物在扩增的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞中包含富集的NK细胞,所述NK细胞是通过CD56(NK)和CD16的共表达所证明的高细胞毒性NK细胞,细胞组合物还包含具有不成熟表型的细胞,所述表型具有成熟变成甚至反应性更高和细胞毒性更强的细胞的潜力,如通过在CD16+和CD16-NK细胞两者上均没有CD57表达的NK细胞的数目所证明的。

[0213] 测量了无饲养层培养扩增的激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞的第10天样品的不同 $\gamma\delta$ T细胞子集的频率分布,如通过流式细胞术所分析的。与受MHC限制的 $\alpha\beta$ T细胞相比, $\gamma\delta$ T细胞能够以不受MHC限制的方式识别和溶解多种癌症,从而突出了其用于现成的同种异体免疫疗法的潜力。基于 $\delta$ 链表达,人类 $\gamma\delta$ T细胞可分为三个主要群体。在健康成人中,大多数(至多50%-90%)循环 $\gamma\delta$ T淋巴细胞表达 $\gamma\delta$ 2链。表达 $\gamma\delta$ 1链的 $\gamma\delta$ T细胞在粘膜表面的上皮内层

中最突出,在面对损伤、感染或转化时,它们参与维持上皮组织的完整性,但是,它们也可能出现在外周血中。 $\gamma\delta$ T细胞占循环T细胞的约0.2%,包括CD4+、CD8+和CD4-CD8-子集。尽管在外周血中不常见,但 $\gamma\delta$ T细胞通常在肝脏中的含量更高。第10天的 $\gamma\delta$ TCR+T细胞的百分比分布(41% $\gamma\delta$ 1、50% $\gamma\delta$ 2、7%其他 $\gamma\delta$ )清楚地表明,繁殖的 $\gamma\delta$ T细胞是多克隆的,因为它们表达V $\delta$ 1、V $\delta$ 2和V $\delta$ 1<sup>neg</sup>V $\delta$ 2<sup>neg</sup>子集。这种多克隆性将确保繁殖的 $\gamma\delta$ T细胞参与先天杀伤肿瘤、已改变的细胞或感染。

[0214] 图3示出了在无饲养层培养扩增的激活的 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞的第10天样品中, $\gamma\delta$ TCR+细胞上T细胞谱系标志物CD4(辅助细胞)和CD8(细胞毒性)的频率和分布,如通过流式细胞术所分析的。大多数 $\gamma\delta$ 1T细胞都不表达CD4或CD8,但是一小部分(19%)确实表达了细胞毒性CD8谱系标志物,这与针对最大的肿瘤和感染杀伤描述且期望的先天溶细胞免疫群体一致。 $\gamma\delta$ 2+细胞几乎不表达CD4或CD8,而几乎一半的主要由 $\gamma\delta$ 3T细胞构成的“其他 $\gamma\delta$ TCR+细胞”则表达细胞毒性CD8谱系标志物。

[0215] 获得额外第8天的流式细胞术表型分析数据,其中 $\gamma\delta$ T细胞是从无饲养层培养扩增的激活的 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞获得的,所述 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞已被研究规模的Miltenyi Biotec, Inc.的 $\alpha\beta$ T细胞去除试剂所去除。与大规模去除的细胞一样,第8天培养的CD3+T细胞主要表达 $\gamma\delta$ T细胞受体(<0.05% $\alpha\beta$ TCR+细胞)。进行表型分析,并分析 $\gamma\delta$ T细胞上标志物的共表达。所有细胞都是CD3+,并且31.8%是CD16+。观察到CD57和CD16在CD3+ $\gamma\delta$ T细胞上的共表达。10.7%的细胞共表达CD57和CD16标志物,因此是最成熟的细胞。大多数是CD57-和CD16-(57%),因此代表未成熟的细胞。分析了抑制性和激活性配体受体的表达。NKG2D是NK细胞表面上的激活受体。NKG2A与CD94二聚形成抑制受体。细胞缺乏NKG2C的表达,并且55%的细胞共表达NKG2A和NKG2D。进行表型分析,并分析与CD56的共表达相关的 $\gamma\delta$ T细胞上标志物的共表达。在表达CD3+和CD56+的所有 $\gamma\delta$ 细胞中,有29%共表达CD16。在CD3+CD56+ $\gamma\delta$ T细胞上观察到CD57和CD16的共表达。5%的细胞共表达CD57和CD16标志物,因此是最成熟的细胞。大多数是CD57-和CD16-(67%),因此代表未成熟的细胞。分析了抑制性和激活性配体受体的表达。细胞缺乏CD3+CD56+细胞上NKG2C的表达,其中大多数细胞(82%)表达NKG2A,并且80%的CD3+CD56+细胞共表达NKG2A和NKG2D,表明这些细胞表达最常与NK细胞相关且指示活跃的先天免疫细胞群体的表型标志物。

[0216] 实施例2:从 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞群体中扩增转导的特定先天溶细胞性免疫细胞(INNATE-CAR)

[0217] 本实施例描述了包含NK和 $\gamma\delta$ TCR+T细胞的转导的特定先天溶细胞性免疫细胞(INNATE-CAR)群体的扩增和生产,所述INNATE-CAR是在无饲养层的培养条件下从 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞群体的激活培养物中扩增而来的:

[0218] 1. 在第4天如实施例1步骤#5中所述从激活的培养扩增的 $\alpha\beta$ TCR<sup>neg</sup>细胞群体中取得细胞的等分试样(或者也可以从第5-15天取得等分试样),并将其以 $0.25 \times 10^6$ /ml的浓度在500IU/mL人白细胞介素2(IL-2)或10ng/ml IL-15的存在下接种到以人纤连蛋白包被的平板上(或者,也可以使用以RetroNectin<sup>TM</sup>(Takara Bio USA, Mountain View CA)包被的平板或VECTOFUSIN-1(Miltenyi Biotec)转导增强剂),并用含有用于CD+19嵌合抗原受体的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液转导,所述嵌合抗原受体含有用作细胞转导标志物的CD34表面抗原的非功能性片段。



[0219] 2. 三天后,将细胞分离并在24孔板或T75中以 $0.25 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在补充有5% AB血清和500 IU/mL人白细胞介素2 (IL-2) 的NK MACS™培养基 (#130-107-879 (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)) 中进一步扩增;替代的培养容器可以包括生物反应器 (G-Rex™25ml, Wilson Wolf Manufacturing, St. Paul MN)。

[0220] 3. 每3天用新鲜培养基和新鲜IL-2以实施例1的#6中描述的浓度进行培养基更换,并以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /mL的浓度接种细胞;当接种到生物反应器中时,培养基更换将每7天进行一次,直到达到目标剂量为止。

[0221] 4. 在第14天后的任何时间,可以分别对不想要的群体进行CD3+去除或CD56+去除,从而使INNATE-CAR群体针对NK-CAR或 $\gamma \delta$ -CAR T细胞进一步富集以获得纯的细胞群体,并像在步骤#3中那样进一步培养。

[0222] 5. 扩增结束时,将细胞冷冻保存在含有10% DMSO溶液的无血清冷冻介质 (CryoStor, BioLife Solutions, Bothell, WA) 中。

[0223] 图4示出了截至第10天CAR.19 INNATE-K细胞的扩增速率的分析。与扩增的非基因修饰群体相似,培养物在一周左右就开始显示出对数扩增,这代表了现成的INNATE-CAR产品的强大扩增潜力。在图4中,将激活的INNATE-K细胞在无饲养层的培养条件下培养扩增,并在第4天用含有CD19CAR和非功能性CD34标志物的 $\gamma$  逆转录病毒转导。

[0224] (在三种不同的生产中) 比较了INNATE-CAR群体、NK细胞和 $\gamma \delta$ TCR+T细胞的转导。具体而言,使用掺入CAR分子中的CD34标志物比较了这些细胞群体中每一者中的% CAR.CD19表达。NK和 $\gamma \delta$ TCR+ T群体均显示出CAR.CD19逆转录病毒载体的显著转导,如通过分析已声明的细胞子集中的CD34标志物所证明的。NK和 $\gamma \delta$ TCR+T细胞的平均转导效率分别为33%和30%。对扩增了10天并且没有用携带CAR.CD19的逆转录病毒载体转导的无饲养层的NK细胞进行流式细胞术分析 (荧光激活细胞分选仪,或FACS分析),这显示了CD56+细胞上CD34+染色的特异性。对在激活过程的第+4天用携带CAR.CD19的逆转录病毒载体遗传修饰并且扩增了10天的无饲养层的NK细胞进行流式细胞术 (FACS) 分析。结果显示,进行转导后,在CD34+细胞的百分比和表达的平均荧光强度两方面,CD56+细胞上的CAR的表达水平都很高。这两个特征都与高效的肿瘤识别有关。在转导和扩增的INNATE群体中存在无饲养层的 $\gamma \delta$ TCR T细胞的情况下,同样的观察也是有效的。实际上,如通过对 $\gamma \delta$ TCR T细胞中CD34表达的分析所评估的, $\gamma \delta$ TCR T细胞组分被显著转导。

[0225] INNATE-CAR平台在识别和消除肿瘤方面非常高效,在先天活性与CAR介导的功能之间具有很强的协同作用。实际上,图5图解说明了来自共培养物细胞毒性分析的数据,其中INNATE细胞和INNATE-CAR.CD19细胞与CD19+白血病 (221) 或CD19+淋巴瘤 (Daudi) 细胞系共培养。对于不同的细胞效应物,培养后残留肿瘤的百分比在上图中表示。非转导的NK细胞 (INNATE-NK) 分别杀死40%和29%的白血病和淋巴瘤肿瘤细胞,而以NK和 $\gamma \delta$ TCR T细胞组合群为特征的INNATE-K细胞则分别杀死88.4%和96.1%的肿瘤细胞。用CAR.CD19转导INNATE-NK细胞 (INNATE-NK-CAR.CD19) 可消除93%和84%的肿瘤细胞,而INNATE-CAR.CD19组合群杀死了几乎所有的肿瘤细胞 (97%和99%)。

[0226] 实施例3: INNATE-NK细胞的替代富集

[0227] 该实施例描述了一种富集INNATE-NK细胞的方法:

[0228] 1. 用NK DEPLETION KIT™ (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) 从血沉棕

黄层分离NK细胞。

[0229] 2.用NK Cell ACTIVATION/EXPANSION KIT™(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) 和重组人IL-2 (500U/ml) 激活NK细胞。

[0230] 3.激活后第0天,将NK细胞在5%AB血清富集的培养基(NK MACS™培养基(#130-107-879Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) 中培养。

[0231] 4.在第4至15天,在500IU/mL人白细胞介素2(IL-2) 存在下,以 $0.25 \times 10^6$ /ml的浓度将细胞的等分试样在人纤连蛋白包被的平板中进行转导。

[0232] 5.三天后,将细胞分离,并以 $0.25 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度,在5%AB血清富集的培养基和500IU/mL人白细胞介素2(IL-2) 中进一步扩增。

[0233] 6.转导后,将NK细胞接种于24孔板中,然后置于T烧瓶或生物反应器中。

[0234] 7.每3天用新鲜培养基和新鲜IL-2进行培养基更换,并以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /mL的浓度接种细胞(当它们处于平板中时),直到达到目标细胞数为止。每七天更换一次生物反应器培养物。

[0235] 8.在第+14天,在T细胞污染超过5%的情况下,将未转导和CAR转导的INNATE-NK细胞重新去除CD3+细胞,以获得纯的NK细胞,并像步骤#7那样进一步培养。

[0236] 先天免疫细胞的大于90% (>90%) 的示例性高度富集的NK群体在平板和生物反应器中均稳健地扩增,如图6-8图解说明。图6显示了几天内平板中扩增的INNATE-NK细胞群体的总数。图7比较了平板与生物反应器扩增的INNATE-NK群体的总细胞数。图8显示了体外扩增不同时间点的子集细胞组成,显示了INNATE-NK的显著纯度(由超过95%的NK细胞代表),以及CD3+T细胞和NKT细胞的存在可忽略不计。

[0237] 使用流式细胞术(FACS) 分析来评估CAR.CD19分子中包含的CD34标志物,证明了CAR转导效率的水平。无饲养层地扩增的非转导INNATE-NK细胞不表达CD34标志物。在第4天用携带CAR.CD19的逆转录病毒载体对INNATE-NK细胞进行遗传修饰。INNATE-NK CAR细胞被显著转导,在NK群体(CD56+) 中有高百分比的CAR+细胞。如图9所示,在长时间的体外培养过程中,INNATE-NK CAR细胞中的CAR分子表达是稳定的。

[0238] 图10示出了INNATE-NK和INNATE-NK CAR群体扩增后激活和溶细胞分子的表达增加,该图分别图解显示了INNATE-NK和INNATE-NK-CAR.19细胞的流式细胞术分析的数据。该分析包括评估与先天细胞的激活和成熟相关的若干NK标志物。特别地,包括CD16作为成熟分析的基本标志物,其与具有较高的细胞溶解活性但较低的增殖能力的更成熟的NK亚组相关;用于激活和增殖NK群体的信号分子和共刺激分子,包括CD2、LFA-1、NKp44、NKp30和NKp46和DNAM-1。所有这些标志物在INNATE-NK和INNATE-NK.CAR.19细胞的扩增群体中均显著增加,表明这些细胞与循环外周血NK细胞相比被激活。

[0239] 图11图解说明了无饲养层地扩增的INNATE-NK细胞和INNATE-NK CAR细胞中缺少耗尽。如实施例3中所述产生并扩增INNATE-NK和INNATE-NK-CAR.19细胞,并在第20天和第60天进行流式细胞术分析以评估细胞成熟度和耗尽的标志物。LIR-1是先天细胞抑制活性的标志物,并且在第20天时以及在第60天时在这两个群体仅显示较小的增加;NKG2c是信号特异性活性和成熟度的标志物,并且在培养期间没有变化;CD57是成熟度的标志物,并且与增殖潜力降低有关,因此它在源自健康供体外周血的循环NK群体上表达。在体外扩增的20天和60天,无饲养层地扩增的INNATE-NK细胞显示出非常低的CD57+NK细胞百分

比,表明这些细胞在体内输注后仍具有增殖潜力。程序性细胞死亡1分子(PD-1)不仅在T细胞中是细胞潜力降低和“耗尽”的标志物,而且最近在NK细胞中也被描述为检查点抑制剂。在20天或60天时,INNATE-NK和INNATE-NK CAR细胞群体均未显示出PD-1+细胞子集的存在,表明在延长的体外培养后细胞并未耗尽。

[0240] 图12图解说明了使用INNATE-NK或INNATE-NK-CAR.19和4种肿瘤细胞系的细胞毒性共培养测定:A行:221,一种CD19+白血病细胞系;B行:Daudi,一种CD19+淋巴瘤细胞系;C行:BV173,一种CD19+(可变表达)pre-B肿瘤细胞系;和D行:KARPAS,一种CD19-肿瘤细胞系。图12的图片1显示了在与INNATE-NK(左侧小图)或INNATE-NK.CAR.19(右侧小图)细胞体外共培养之后,CD19+细胞的减少。INNATE-NK图片左上角的框(描边的框)突出显示了与未修饰的INNATE-NK细胞共培养之后的CD19+肿瘤群体。INNATE-NK.CAR.19图片左上角的框(描边的框)突出显示了与INNATE-NK.CAR.19细胞共培养后,残留的CD19+肿瘤群体。在体外共培养五天后,INNATE-NK.CAR.19细胞能够对CD19+221和DAUDI肿瘤靶标发挥显著的肿瘤控制作用,而残留肿瘤的量则可忽略不计。BV173对识别和消除显示出更高的抗性,尽管与未修饰的INNATE-NK细胞相比,用CAR.CD19对INNATE-NK细胞进行遗传修饰能够显著提高抗肿瘤活性。图12的图片2中显示了对于每个共培养实验,在10个不同实验中观察到的残留肿瘤的平均值。脱粒(通过短暂的体外共培养三小时后NK细胞的CD107a表达进行分析)代表了INNATE-NK和INNATE-NK CAR效应细胞的细胞溶解活性,如图12的图片3所示(第A-D行)。在所有情况下,INNATE-NK.CAR.19细胞都比INNATE-NK细胞表达更高的细胞溶解活性;在以KARPAS共培养条件为代表的阴性对照中,两个群体均未表达CD107a脱粒标志物。图12的图片4和5显示了调节性细胞因子的生产,其通常在淋巴细胞溶细胞活性的情况下生产。这两种细胞因子的水平在CD19 CAR T细胞给药过程中都很高,并且被认为可能在细胞因子释放综合征中发挥作用。在针对CD19+肿瘤细胞的INNATE-NK和INNATE-NK CAR活性的情况下,IFN $\alpha$ 和TNF $\alpha$ 两者的细胞因子生产范围为20-150pg/ml/10<sup>6</sup>细胞,比适应性T细胞杀伤的细胞因子生产低很多倍。甚至在高靶点杀伤的情况下,细胞因子的分泌量也没有对于CAR-T所见到的分泌量(通常高100至1,000倍)那么高,因此代表了潜在的毒性较小的疗法。

[0241] 图13-15图解说明了INNATE-NK和INNATE-NK CAR细胞能够对原代Bcp-ALL母细胞发挥显著的抗肿瘤活性。图13和14图解说明了对于INNATE-NK细胞和INNATE-NK-CAR.19细胞群体,在不同的测试运行中原发性肿瘤细胞的特异性溶解百分率作为效应物(E)与靶标(T)的比率的函数;INNATE-NK-CAR.19细胞群体在所有E:T范围内均更为有效。图15图解说明了与效应细胞(INNATE-NK细胞和INNATE-NK-CAR.19细胞群体)共培养后,与在无效效应细胞的情况下接种原代CD19+白血病母细胞的对照条件相比,残留原代CD19+肿瘤的百分比。与INNATE-NK细胞共培养产生了约18%的残留肿瘤细胞,并且与INNATE-NK-CAR.19细胞群体共培养产生了约5%的残留肿瘤细胞。

[0242] 在体内CD19+淋巴瘤小鼠模型的一个实施例中,每只NGS小鼠都接受了 $0.25 \times 10^6$ 以萤火虫荧光素酶遗传修饰的肿瘤细胞的静脉内(IV)给药,因此可以通过生物荧光分析进行分析。3天后,显示在注射的小鼠中建立了白血病,使其在接受 $5 \times 10^6$  INNATE-NK或INNATE-NK-CAR.19的静脉内输注的小鼠的治疗队列中被随机分配。在实验过程中分析动物的萤光素酶+肿瘤细胞的存在。将数据与来自具有相同设计的另一实验的数据进行比较,但是在该实验中,动物接受了 $5 \times 10^6$ 未修饰的适应性T细胞。

**[0243] 实施例4: INNATE-NK研究**

**[0244]** 本实施例描述的数据表明,与相同剂量的适应性T细胞相比,一剂未经基因修饰的INNATE-NK细胞能够延长动物的死亡时间。静脉内施用 $0.25 \times 10^6$ 肿瘤细胞并使其扩增3天。静脉内施用 $5 \times 10^6$ INNATE-NK或INNATE-NK-CAR,并将数据与来自使用5M适应性T细胞的实验的数据进行比较。在接受INNATE-NK CAR.19的小鼠中,肿瘤被完全控制,在第11天后未检测到肿瘤生物荧光,这表明INNATE-NK-CAR19根除了肿瘤,直到第72天(实验结束)都没有任何复发。重要的是,INNATE-NK细胞也没有显示异种反应(在使用CAR T细胞的情况下,历史上在这个时间点会看到)。数据还显示,与相同剂量的适应性T细胞相比,一剂未基因修饰的INNATE-NK细胞能够延长动物的总体存活期(分别为第50天对比第28天)。图16图解说明了来自上述实验的接受INNATE-NK和INNATE-NK-CAR.19细胞的动物的存活曲线。与接受未经修饰的INNATE-NK细胞的接受者相比,INNATE-NK.CAR.19接受者的数据曲线显示了更高的存活率。

**[0245] 实施例5:针对实体瘤的INNATE-NK细胞**

**[0246]** 该实施例证实INNATE-NK细胞是治疗实体瘤的合适平台。在该实施例中,考虑了神经母细胞瘤模型。如实施例3步骤1-8中所述产生INNATE-NK和INNATE-NK CAR细胞。在第4天用逆转录病毒载体对INNATE-NK细胞进行遗传修饰,所述逆转录病毒载体携带有对由神经母细胞瘤肿瘤细胞表达的GD2抗原特异的第三代CAR。结果证明了INNATE-NK CAR.GD2的产生,显示了CD56+细胞中CAR表达的显著水平,这是通过抗独特型抗体(1A7)的染色,通过流式细胞术(FACS)分析评估的。INNATE-NK CAR.GD2生产中NK群体的纯度以可忽略的CD3+细胞百分比来评估,而CAR+细胞的水平以1A7+细胞来评估。INNATE-NK CAR中CAR.GD2的表达在延长的体外培养过程中是稳定的(在第8天、第15天、第25天、第31天、第35天测量)。

**[0247] 实施例6:评估先天免疫在实体瘤穿透中的作用**

**[0248]** 该实施例评估了先天免疫在其穿透实体瘤的能力中的作用。为此,在MATRIGEL™培养物中培养了3-D神经母细胞瘤肿瘤细胞球体,然后引入了适应性T细胞、INNATE-NK或INNATE-NK-CAR.GD2细胞并评估了它们入侵球体的能力。具体而言,使用SH-SY5Y神经母细胞瘤肿瘤细胞创建了实体3-D肿瘤模型,对它们进行了遗传修饰以表达绿色荧光蛋白(GFP),然后在体外培养以形成实体3-D肿瘤球。用红色荧光发射细胞标志物标记适应性外周血T细胞、未修饰的INNATE-NK细胞和INNATE-NK.CAR.GD2,并将它们与肿瘤球一起孵育。通过3-D荧光显微术在3个平面中分析神经球,以评估细胞在肿瘤球中的位置以及它们入侵肿瘤的相对能力。适应性T细胞(红色)的共聚焦显微镜图像显示,适应性T细胞无法主动穿透3-D肿瘤,因为如在所有3个平面中所观察到的,它们仅位于肿瘤球(绿色)的外表面,并且没有迁移到肿瘤中心。其他图像显示,如在所有3个平面中所观察到的,INNATE-NK细胞(红色)开始突破肿瘤球的表面;并且INNATE-NK-CAR.GD2细胞突破了肿瘤球的表面,表明这些细胞都具有向肿瘤内迁移一定距离的能力,在所有3个平面中均观察到。

**[0249] 实施例7:交联激活与可溶性激活**

**[0250]** 如实施例1所述,在用交联的天然细胞毒性受体(NCR)抗体(例如抗NKp46)与淋巴细胞功能相关抗原(LFA)抗体(例如抗CD2)的组合(“包被的珠子”;Miltenyi Biotec)激活后,在培养物中产生了细胞群体。本文讨论的被NCR抗体(例如抗NKp46)和LFA抗体(例如抗CD2)的组合激活并包含NK细胞和 $\gamma \delta$ T细胞的混合物的细胞群体在本文中称为“BINATE”细

胞群体(并且在上述某些实施例中称为“INNATE-K”细胞)。在该实施例中,在用以下物质之一激活后分析所得的BINATE群体:1) 交联的抗NKp46(克隆9E2 500ng/ml;Miltenyi Biotec)和交联的抗CD2(OKT11 500ng/ml)的组合,或2) 可溶性抗NKp46(克隆9E2 500ng/ml)和可溶性抗CD2(克隆OKT11500ng/ml)的组合。通过在实验开始前用PBS中的抗体组合涂布烧瓶24小时,然后倒出抗体溶液并在实验时用PBS冲洗来实现交联(在本文中称为包被平板)。

[0251] 1. 将来自正常健康供体的血沉棕黄层在离心机中通过手动分离进行Ficoll™梯度细胞分离(在本实施例和本文其他实施例中所述方法的某些变体中,正常健康供体经历单采血液成份法程序(单采血液成份法;通常不进行Ficoll™梯度细胞分离),并且通常在Terumo Optia机器上按照标准程序收集单核细胞产物)。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除(在本实施例和本文其他实施例中所述方法的某些变体中,可能会使用CLINIMACS分离装置对单采血液成份法产物进行 $\alpha\beta$ T细胞去除;进一步去除可能包括CD19 B细胞去除。可以将去除了 $\alpha\beta$ T细胞的单核细胞的等分试样冷冻保存,然后用于扩增)。在无饲养层的培养中,用补充有5%AB血清的BINATE培养基(即NK MACS™培养基(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)) (或者也可以使用其他培养基,例如Life Technologies、R&D systems培养基、CELLGENIX培养基等,有或没有使用人血清))和500IU/mL人白细胞介素2(IL-2)(Miltenyi Biotec),以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度,在没有额外的激活试剂的24孔涂布平板中,或在具有500ng/ml可溶性抗NKp46(克隆9E2)和500ng/ml抗CD2(克隆OKT11)的組合的24孔未涂布平板中(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)将得到的 $\alpha\beta$ TCR-neg细胞群体激活。

[0252] 2. 在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。在该实施例和本文其他实施例中的方法的某些变体中,在扩增1周、2周、3周、4周或5周后,可以将培养的BINATE细胞冷冻保存。在一个实施例中,洗涤扩增的BINATE细胞,然后浓缩,并添加无血清的冷冻保存介质(BIOLIFE)。冷冻保存的BINATE产品可以融化并如本文所述再次接种以进一步培养,或者可以融化并输入例如患有癌症或病毒感染的患者中。

[0253] 3. 在第15天扩增结束时,对BINATE细胞的NK和 $\gamma\delta$ CD3+T细胞含量及其子集(如CD56)进行了具体分析,并对潜在的污染细胞类型(例如 $\alpha\beta$ TCR+T细胞)另外进行了分析。

[0254] BINATE细胞的表型(作为总细胞群体的百分比报道)显示在包被平板上的激活或用可溶性抗体激活之间没有差异。在包被平板上激活时,NK群体(CD56+CD3-)占最终群体的89.1%,而用可溶性抗体激活时为92%。包被平板和可溶性条件中的CD3+ $\gamma\delta$ T细胞分别占群体的6.2%和5.5%。CD3+CD56+ $\gamma\delta$ T细胞和CD3+CD56- $\gamma\delta$ T细胞在包被平板激活的培养物中分别占群体的2.8%和3.4%,而在可溶性激活培养物中分别占群体的3.3%和2.2%。在这两种条件下, $\alpha\beta$ TCR+CD3+T细胞的百分比可以忽略不计,在包被激活中为0.12%并且在可溶性激活中为0.41%。

[0255] 虽然历史报道已经表明,使用交联抗体可能具有更大的活性,但是由于例如对培

养物的更好控制,通常优选使用可溶性抗体而不是使用交联抗体(例如,用于例如平板或珠子等表面上)。与交联条件相比,可溶性抗NKp46(克隆9E2,Miltenyi)和可溶性抗CD2(克隆OKT11)的使用没有差异,并且随后所有实验均用可溶性抗体激活试剂进行。

[0256] 实施例8:使用不同量的抗NKp46评估激活和扩增

[0257] 在独立的实验中,在以下两种扩增条件下,以3种浓度(10ng/ml、50ng/ml和500ng/ml)评估了不同的抗NKp46(Bab281)试剂:1) IL-2(500IU/mL人白细胞介素2(Miltenyi Biotec))或2) IL-15(10ng/ml人白细胞介素15(Miltenyi Biotec))。

[0258] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和IL-2或IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有500ng/ml抗CD2(克隆OKT11)与以下3种浓度之一的抗NKp46(Bab281)的组合:10ng/ml、50ng/ml或500ng/ml。

[0259] 2.在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0260] 3.在第15天扩增结束时,对BINATE细胞的NK和 $\gamma\delta$ CD3+T细胞含量及其子集(例如CD56)进行了分析,并对潜在的污染细胞类型(例如 $\alpha\beta$ TCR+T细胞)另外进行了分析。

[0261] BINATE细胞的表型(作为总细胞群体的百分比报道)显示,当通过IL-15扩增进行培养扩增时,在3种浓度的抗NKp46(Bab281)之间没有显著差异。当使用500ng/ml抗NKp46(Bab281)、50ng/ml抗NKp46(Bab281)和10ng/ml抗NKp46(Bab281)时,NK群体(CD56+CD3-)分别占84.5%、87%和87.2%。 $\gamma\delta$ TCR CD3+群体分别占11.4%、8.7%和8.1%,而CD3+56+群体分别占7.40%、5.40%和5.30%。在所有浓度下几乎都无法检测到 $\alpha\beta$ TCR+细胞。

[0262] 表1

[0263]

总的 BINATE 表型%	CD56+ CD3-	CD3+	CD3+ CD56+	CD3+ CD56-	$\alpha\beta$ TCR+
Bab281 500 ng/OKT11 500 ng/IL-15	84.50	11.40	7.40	4.00	0.00
Bab281 50 ng/OKT11 500 ng/IL-15	87.00	8.70	5.40	3.30	0.01
Bab281 10 ng/OKT11 500 ng/IL-15	87.20	8.10	5.30	2.80	0.01

总的 BINATE 表型%	CD56+ CD3-	CD3+	CD3+ CD56+	CD3+ CD56-	$\alpha\beta$ TCR+
[0264] Bab281 500 ng/OKT11 500 ng/IL-2	85.70	4.40	2.90	1.40	0.00
Bab281 50 ng/OKT11 500 ng/IL-2	82.80	4.50	3.90	0.60	0.00
Bab281 10 ng/OKT11 500 ng/IL-2	82.40	4.80	4.00	0.80	0.09

[0265] 实施例9:激活和扩增细胞的标志物评估

[0266] 在独立的实验中,比较了在用10ng/ml良好生产规范(GMP)品质的抗NKp46(Bab281)抗体与500ng/ml GMP品质的抗CD2(OKT11)抗体的组合在两种扩增条件(即IL-2和IL-15)下激活后的BINATE表型。

[0267] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有500ng/ml抗CD2(OKT11)和10ng/ml抗NKp46(Bab281)(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0268] 2.在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0269] 3.在第20天培养扩增结束时,对BINATE细胞的先天、细胞毒性和耗尽表达细胞含量的标志物及其子集(例如CD56、CD16和CD57)进行了具体分析,并对潜在的污染细胞类型(例如 $\alpha\beta$ TCR+T细胞)另外进行了分析。

[0270] 在IL-15和IL-2扩增后,总BINATE细胞群体分别包含92%和84.3%的CD56+先天细胞。在IL-15和IL-2培养扩增后,该群体分别包含33%和12%的CD56+CD16+细胞毒性先天细胞、76%和59.6%的CD8+细胞毒性先天细胞以及99%和96.5%的CD56+CD57-未成熟先天细胞。IL-15或IL-2培养扩增后均未检测到 $\alpha\beta$ TCR+T细胞。在下表2中提供NK和 $\gamma\delta$ T细胞的CD4+、CD8+和CD4-CD8-群体。

[0271] 表2

	CD4+	CD8+	CD4-CD8-
[0272] NK IL-15	0	77.9	22.1
$\gamma\delta$ T细胞IL-15	1.2	20.7	76.1

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

[0273] 实施例10:评估在静态和生物反应器培养条件下扩增的细胞

[0274] 在独立的实验中,比较了在用50ng/ml GMP品质的抗NKp46 (Bab281) 抗体与50ng/ml GMP品质的抗CD2 (OKT11) 抗体的组合在两种扩增条件 (IL-2和IL-15) 下激活后,静态和生物反应器培养条件下的BINATE增殖。

[0275] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha$  $\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有50ng/ml抗CD2 (OKT11) 与50ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0276] 2.在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶或G-Rex台式生物反应器中将激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器 (G-Rex) 中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0277] 3.激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体也可以在无饲养层的培养条件下,在具有BINATE培养基和10ng/ml IL-15的GRex培养装置中以 $1 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度进一步培养扩增。每7天用新鲜的BINATE培养基和IL-15进行培养基更换。

[0278] 总BINATE扩增显示为图17中的总细胞数。在烧瓶中在补充有IL-2或IL-15的BINATE培养基中,激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞扩增在41天的周期内是等同的。同样,在最初的21天中,生物反应器中的激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体的IL-15扩增与烧瓶中的IL-15扩增相同。

[0279] 实施例11:评估激活和扩增细胞的同种异体反应性

[0280] 在独立的实验中,评估了在IL-2或IL-15中扩增的BINATE激活细胞群体的同种异体反应性。

[0281] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha$  $\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有50ng/ml抗CD2 (OKT11) 与50ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0282] 2.激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增。对于烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换。

[0283] 3.在单向混合淋巴细胞反应 (MLR) 中测试了BINATE细胞和来源于3名随机健康供体 (HD) 的PBMC的刺激细胞。合并来自三名HD的刺激细胞,并在使用前进行辐射(30Gy)。将BINATE细胞以100 $\mu$ l/孔( $1 \times 10^5$ 细胞)接种在BINATE培养基的平底微量滴定板的96孔中,其中存在200 $\mu$ l的相等数量的刺激细胞。孵育5天后,将培养物用18kBq  $^3$ H-胸苷脉冲处理12小



时,并在玻璃纤维过滤器上收获。在Microbeta Trilux 1450计数器(Wallac,Perkin Elmer)上对干燥的过滤器计数。结果表示为SI(具有抗原的cpm/cpm背景)。未添加细胞因子的BINATE细胞用作阴性对照,而阳性对照由接种细胞因子(IL-2或IL-15)的BINATE细胞表示。

[0284] 分析混合淋巴细胞共培养物中的<sup>3</sup>H胸苷掺入(CPM),这是增殖的指标。在IL-15实验中,阴性对照由未补充IL-15的未刺激的BINATE细胞组成并且<sup>3</sup>H胸苷摄取值为1144,表明基本上没有增殖。辐射的合并健康供体细胞(HD)的<sup>3</sup>H胸苷摄取值为1194,也表明没有增殖。阳性对照包括用IL-15进行增殖刺激并且<sup>3</sup>H胸苷摄取值为15558,比阴性对照增加14倍。已经在IL-15中扩增的激活BINATE细胞的<sup>3</sup>H胸苷摄取值为942,与背景基本无差异。

[0285] 在IL-2实验中,阴性对照包括未补充IL-2的未刺激的BINATE细胞并且<sup>3</sup>H胸苷摄取值为834,表明基本上没有增殖。辐射的合并健康供体细胞(HD)的<sup>3</sup>H胸苷摄取值为1194,也表明没有增殖。阳性对照包括用IL-2进行增殖刺激并且<sup>3</sup>H胸苷摄取值为18834,比阴性对照增加22倍。已经在IL-15中扩增的激活BINATE细胞的<sup>3</sup>H胸苷摄取值为1245,与背景对照基本无差异。

[0286] 没有MLR反应可能是由于缺乏 $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup> T细胞,并支持先天BINATE细胞群体中缺少同种异体反应性。在临床上,没有同种异体反应性很重要,因为它支持了细胞缺少导致移植物抗宿主反应的潜力。

[0287] 实施例12:评估不同扩增条件下的细胞增殖和表型

[0288] 在独立的实验中,比较了在5种不同的扩增条件下用GMP品质的抗NKp46(Bab281)抗体(50ng/ml)(Caprico)和GMP品质的抗CD2(OKT11)抗体(50ng/ml)(Caprico)激活后的增殖能力和BINATE表型。

[0289] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi Ls柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ TCR细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基的无饲养层的培养条件下的24孔板和一种以下扩增补充物中,所述BINATE培养基具有50ng/ml抗CD2(OKT11)与50ng/ml抗NKp46(Bab281)的组合(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活):

[0290] a.500IU/mL IL-2(Miltenyi Biotec)

[0291] b.10ng/ml IL-15(Miltenyi Biotec)

[0292] c.500IU/mL IL-2与IL-15 10ng/mL的组合(IL-2/IL-15)

[0293] d.500IU/mL IL-2与10ng/ml OKT3克隆抗CD3抗体的组合(Miltenyi Biotec)(IL-2/OKT3)

[0294] e.IL-15 10ng/mL与500IU/mL IL-2和10ng/ml OKT3的组合(IL-2/IL-15/OKT3)。

[0295] 2.在使用BINATE培养基的无饲养层的培养条件下和以上所列的五种扩增条件中的一种条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天)),并且在初始培养激活和扩增阶段中使用相同的扩增条件。

[0296] 总BINATE扩增显示为图18中的总细胞数。在烧瓶中在补充有IL-2、IL-15或IL-2/OKT3的BINATE培养基中,激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞扩增在40天的周期内是等同的。在补充有IL-2/IL-15或IL-2/IL-15/OKT3的BINATE培养基中,烧瓶中的激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞扩增在26天的周期内是等同的,然后增殖速度减慢,并且从培养第26天到第41天,总细胞数少于其他3组。

[0297] 如下表3所示,在培养扩增的第7天、第20天和第30天,通过流式细胞术确定来自5种条件中每一种的BINATE细胞为NK或 $\gamma\delta$ T细胞。如表4所示,还通过流式细胞术对来自第7天、第20天和第30天的每个条件的细胞分析了细胞上的先天、细胞毒性和耗尽和不成成熟度表达的特异性标志物,以及在 $\gamma\delta$ T细胞中的特异性VdTCR使用。

[0298] 表3

[0299]

	CD56+CD3-	CD3+CD56+	CD3+CD56-	CD3+总计
	NK	$\gamma\delta$ T细胞	$\gamma\delta$ T细胞	$\gamma\delta$ T细胞
IL-15				
第7天	56.25	21.65	14.55	36.2
第20天	83.45	12.55	3.7	16.25
第30天	99.3	0.6	0.1	1.0
IL-2				
第7天	62.4	11.85	12.55	24.4
第20天	56.55	22.95	15.3	38.25
第30天	85.95	12.65	1.15	13.8
IL-2/IL-15				
第7天	52.4	24.15	15.2	39.35
第20天	51.7	36.85	11	47.85
第30天	49.15	49.55	1.15	50.7
IL-2/OKT3				
第7天	29.15	9.4	42.55	51.95
第20天	26.65	26.3	43.25	69.55
第30天	58.9	29.2	5.55	34.75
IL-2/IL-15/OKT3				
第7天	29.8	26.3	43.95	70.25
第20天	36.6	47.5	15.35	62.85
第30天	53.6	44.15	2.15	46.3

[0300]

表 4

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

[0301]

扩增条件	CD56+ CD3- 细 胞 中 的 % CD16+	CD56+ CD3- 细 胞 中 的 % CD57+	CD3+ CD56+ 细 胞 中 的 % CD16+	CD3+ CD56+ 细 胞 中 的 % CD57+	CD3+ CD56+ 细 胞 中 的 % Vd1	CD3+ CD56+ 细 胞 中 的 % Vd2+	CD3+ CD56- 细 胞 中 的 % Vd1	CD3+ CD56- 细 胞 中 的 % Vd1-Vd2-	CD3+ CD56- 细 胞 中 的 % Vd2+	CD3+ CD56- 细 胞 中 的 % Vd1-Vd2-		
	48.70 31.40	17.65 29.90	12.25 14.70	17.80 22.85	13.00 2.55	16.55 19.15	49.05 54.30	32.60 29.20	16.70 16.10	43.35 50.25	38.75 26.25	15.40 22.60
第20天												
第30天												

[0302] 显示PD-1表达很低,它是细胞耗尽的指标。在第30天,IL-15扩增条件在总BINATE群体中显示了2.7%表达,其中CD56+CD3-NK细胞上的表达为2%,CD3+CD56-  $\gamma$   $\delta$ T细胞上的

表达为10.6%，并且CD3+CD56+  $\gamma$   $\delta$ T细胞上的表达为17.05%，证明了并没有耗尽。在IL-2扩增条件下，如通过流式细胞术在IL-2扩增条件下所测定的，PD-1表达低至总BINATE群体的14.2%，其中CD56+CD3-NK细胞表达2%PD-1，并且CD3+CD56-  $\gamma$   $\delta$ T细胞和CD3+CD56+  $\gamma$   $\delta$ T细胞分别表达62.9%和78.3%。

[0303] 实施例13:CD107a细胞毒性

[0304] 将来自实施例12中的5种扩增条件中的每一种的第30天细胞与包括IMR32、SH-SY5Y (神经母细胞瘤细胞系) 和K562 (B细胞白血病细胞系) 的肿瘤细胞系共培养。培养3天后，通过流式细胞术分析在基础BINATE细胞上以及在与对应的肿瘤细胞系共培养的BINATE细胞上测量CD107a的表达，它是细胞毒性颗粒的释放的量度。表5显示了在5种扩增条件(IL-2、IL-2/OKT3、IL-15、IL-2/IL-15和IL-2/IL-15/OKT3) 中的每一种条件下，每个肿瘤细胞系和每个BINATE子集 (CD56+CD3-NK细胞、CD3+CD56+  $\gamma$   $\delta$ T细胞和CD3+CD56-  $\gamma$   $\delta$ T细胞) 的肿瘤刺激表达减去基础值之间的差异。统计显著性报道为T检验的p值。

[0305] 表5

[0306]

CD56+CD3- NK	IMR32 减去		SH-SY5Y		K562 减去	
	基础值	P 值	减去基础值	P 值	基础值	P 值
IL-2	8.60	0.042	29.30	0.069	48.55	0.023
IL-2/OKT3	6.60	0.022	40.55	0.025	57.05	0.005
IL-15	29.60	0.103	35.10	0.050	54.90	0.049
IL-2/IL-15	8.25	0.058	25.90	0.122	50.55	0.045
IL-2/IL-15/OKT3	3.70	0.020	45.35	0.037	47.55	0.079

CD3+CD56+ $\gamma$ $\delta$ T	IMR32 减去		SH-SY5Y		K562 减去	
	基础值	P 值	减去基础值	P 值	基础值	P 值
IL-2	22.05	0.015	21.05	0.066	25.05	0.045
IL-2/OKT3	30.75	0.227	44.40	0.057	35.75	0.259
IL-15	23.45	0.127	45.20	0.033	57.55	0.039
IL-2/IL-15	26.90	0.102	14.90	0.321	28.35	0.024
IL-2/IL-15/OKT3	33.15	0.068	22.70	0.184	35.25	0.199

[0307]

CD3+CD56- $\gamma$ $\delta$ T	IMR32 减去		SH-SY5Y		K562 减去	
	基础值	P 值	减去基础值	P 值	基础值	P 值
IL-2	1.35	0.012	-2.70	0.024	2.85	0.007
IL-2/OKT3	-1.70	0.259	5.05	0.296	3.05	0.405
IL-15	4.15	0.14	22.90	0.192	8.90	0.088
IL-2/IL-15	-7.05	0.277	-4.25	0.264	-1.20	0.433
IL-2/IL-15/OKT3	-0.20	0.443	3.05	0.278	9.70	0.345

[0308] 实施例14:评估不同扩增条件下的表型标志物

[0309] 分析来自实施例12中的3种扩增条件 (条件IL-2、IL-15和IL-2/OKT3) 的第20天细胞的特异性激活、细胞毒性和耗尽标志物。图19示出了针对IL-15扩增条件，通过标志物类型 (激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度) 进行的表型分析。图20示出了针对IL-2扩增条件，通过标志物类型 (激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度) 进行的表型分析。图21示出了针对IL-2/OKT3扩增条件，通过标志物类型 (激活、细胞毒性和耗尽/不成熟度) 进行的表型分析。在所

有条件下, BINATE细胞通常均显示出高的激活和细胞毒性以及低的耗尽。

[0310] 实施例15: 评估体外肿瘤杀伤

[0311] 在独立的实验中, 比较了在用10ng/ml抗NKp46 (Bab281) 抗体与500ng/ml抗CD2 (OKT11) 抗体的组合在两种扩增条件 (IL-2和IL-15) 下激活后, BINATE细胞的体外肿瘤杀伤。

[0312] 1. 在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ TCR细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中, 所述板具有500ng/ml抗CD2 (OKT11) 和10ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合 (或者, 也可以使用其他浓度的激活剂, 并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0313] 2. 在使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下, 以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增 (或者, 细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器 (G-Rex) 中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言, 每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换 (对于生物反应器而言, 更换频率较低 (5-7天))。

[0314] 3. 在20天培养扩增结束时, 将BINATE细胞置于肿瘤共培养实验中历时5-7天。下表6中显示的实验包括在6孔培养皿中以2ml培养基/培养孔、以1:1的效应物与靶标比率 (即, 0.5M BINATE细胞 (效应物) 与0.5M肿瘤细胞 (靶标)) 培养白血病细胞系。

[0315] 下表7中显示的实验包括在6孔培养皿中以2ml培养基/培养孔、以2:1的效应物与靶标比率 (即, 0.5M BINATE细胞 (效应物) 与0.25M肿瘤细胞 (靶标)) 培养实体瘤细胞系 (神经母细胞瘤、肉瘤和结肠肿瘤细胞系)。在不存在细胞因子的情况下进行肿瘤细胞和效应细胞的共培养。在第3-7天通过显微术和流式细胞术评估共培养。

[0316] 在共培养实验中检查残留肿瘤时, 表6显示, 在IL-2或IL-15中扩增的激活BINATE细胞可成功根除所有细胞系中50%或更多的肿瘤细胞, 并且在4-5种AML细胞系中根除超过75%。在表6中, 所有细胞系的短期共培养都导致BINATE细胞杀死所有221个白血病细胞、>80%的Daudi白血病细胞以及多达50%的通常被认为对先天性杀伤具有抗性的Karpas细胞系。

[0317] 表6- 与BINATE细胞共培养后的残留肿瘤细胞

	<b>急性髓细胞性白血病细胞系</b>	<b>IL-2 扩增</b>	<b>IL-15 扩增</b>
	OCI-AML	2.3	0.8
	697	16.7	9.4
[0318]	MV4:11	4.2	22.8
	RS4;11	35.5	54.2
	Molm-1	1	22.8
	THP1	0.5	1.1
	<b>急性淋巴细胞性白血病细胞系</b>		
	Daudi	5.10	9.3
[0319]	221	1.05	0.85
	Karpas	87.6	71.4

[0320] 在共培养实验中检查残留肿瘤时,表7显示,在IL-2或IL-15中扩增的激活BINATE细胞可在短期共培养实验中成功根除神经母细胞瘤肿瘤。IL-2扩增的BINATE细胞没有在结肠癌共培养中进行测试,而IL-15扩增的BINATE细胞显示出针对肉瘤和结肠癌的活性。

[0321] 表7-与BINATE细胞共培养后的残留肿瘤细胞

	BINATE IL-15	BINATE IL-2
神经母细胞瘤		
SH-SY5Y	0.9	4.5
IMR32	0.2	18.7
SKNSH	18.5	27.05
CHLA	3.85	14.75
LAN-1	6.5	10.8
SKNSKBeC	6.8	35.6
肉瘤		
RD	1.7	15.3
A673	0.6	0.7
CT10	0.2	0.7
G401	0.2	ND*
结肠		
SW480	4.6	ND
DLD1	8.3	ND

[0323] \*未测定

[0324] 实施例16:评估体外转导效率

[0325] 在独立的实验中,为了评估转导的稳定性,在用10ng/ml抗NKp46 (Bab281) 抗体与500ng/ml抗CD2 (OKT11) 抗体的组合以及编码第三代GD2嵌合抗原受体 (CAR) 的逆转录病毒

构建体激活后,比较了BINATE细胞的早期和后期体外转导效率。

[0326] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ TCRneg细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有500ng/ml抗CD2(OKT11)和10ng/ml抗Nkp46(Bab281)的组合(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0327] 2.为了产生本文所述的任何BINATE.CAR,在第4-15天自激活的培养扩增的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体获取细胞的等分试样,并在含有用于特异性嵌合抗原受体的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度接种至人纤连蛋白包被的平板或培养袋(Gobain)上。三到四天后,将细胞洗涤,然后继续处理未转导的细胞,这可能包括扩增或冷冻保存。扩增条件可能包含500IU/mL人白细胞介素2(IL-2)或10ng/ml IL-15,但也可能包含本文提及的任何条件组合。本文所用的嵌合抗原受体(CAR)构建体包括CAR.GD2、CAR.123和CAR.CD19,它们含有非功能性标志物,例如CD34表面抗原的片段或突变的CD19片段(某些构建体的描述参见实施例25)。在本文方法的某些变体中,可以使用VECTOFUSION-1(Miltenyi Biotec)代替RETRONECTIN来辅助逆转录病毒转染,并且遗传修饰可以包括对任何选择的抗原的其他CAR构建体进行基因修饰,或以其他分子进行修饰。对于该实施例,在第5天,将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体在含有用于GD2嵌合抗原受体(CAR)的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度置于人纤连蛋白包被的平板(或者培养袋(Gobain)上)。GD2构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0328] 3.三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ )。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0329] 4.转导后第3天和第15天,分析 $\gamma\delta$ T细胞的BINATE细胞子集以及VdTCR子集的突变CD34受体的表达(转导效率的一个指标)。在第3天和第15天,CD56+CD3-NK细胞的转导效率分别为82.4%和82.4%。在第3天和第15天,CD3+56+细胞的转导效率分别为43.2%和62.4%。在第3天和第15天,CD3+CD56- $\gamma\delta$ T细胞的转导效率分别为37.3%和56.8%。遗传修饰在培养时间内是稳定的,这表明高度激活的群体能够实现高转导和永久整合。

[0330] 在类似的实验中,BINATE亚群的转导显示了GD2 CAR构建体的高转导,以及Vd1和Vd2 TCR $\gamma\delta$ T细胞的多克隆转导。CD56+CD3-NK细胞的转导率为69%,而CD3+ $\gamma\delta$ T细胞的转导率为39%。Vd1 TCR群体的转导效率为67%,而Vd2 TCR群体的转导效率为34%。

[0331] 实施例17:评估GD2 CAR体外转导后的增殖

[0332] 在独立的实验中,在IL-2和IL-15扩增条件下,与未修饰的BINATE细胞比较了在用编码第三代GD2 CAR的逆转录病毒构建体体外转导BINATE细胞后并且在用50ng/ml抗Nkp46(Bab281)抗体与50ng/ml抗CD2(OKT11)抗体的组合激活后的增殖能力。

[0333] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ TCRneg细胞去除。将得到的 $\alpha$



$\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有50ng/ml抗CD2 (OKT11) 与50ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0334] 2. 在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度在T75烧瓶中将激活的遗传修饰的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ )。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0335] 3. 在第5天,将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体在含有用于GD2嵌合抗原受体(CAR)的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度置于人纤连蛋白包被的平板或培养袋(Gobain)上。GD2构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0336] 4. 5天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10-ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ )。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0337] 5. 每7天记录BINATE和BINATE.CARGD2群体的细胞数。

[0338] 未修饰的BINATE细胞和BINATE.CARGD2细胞在转导之前进行扩增(由图22中的竖线表示)。对于不同条件,转导后的扩增由图22中的剖面线表示。遗传修饰的细胞或未修饰的细胞之间无显著差异,IL-2或IL-15扩增的总细胞数也无差异。

[0339] 实施例18:评估实体瘤的体外杀伤

[0340] 在独立的实验中,比较了在两种扩增条件(IL-2和IL-15)下用编码第三代GD2 CAR的逆转录病毒构建体转导激活的BINATE之后实体瘤的体外杀伤。

[0341] 1. 在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有500ng/ml抗CD2 (OKT11) 与10ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合(或者,也可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0342] 2. 在第5天,将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体在含有用于GD2嵌合抗原受体的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度置于人纤连蛋白包被的平板或培养袋(Gobain)上。GD2构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0343] 3. 三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2或10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ )。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2或IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0344] 4. 在20天培养扩增结束时,将BINATE细胞置于肿瘤共培养实验中历时5-7天。实验包括在6孔培养皿中以2ml培养基/培养孔、以1:1的效应物与靶标比率(即,0.5M BINATE细胞或BINATE.CAR.GD2细胞(效应物)与0.5M肿瘤细胞(靶标))培养。在不存在细胞因子的情况下进行肿瘤细胞和效应细胞的共培养。在第3-7天通过显微术和流式细胞术评估共培养。

[0345] 表8显示了在肿瘤与未修饰的BINATE IL-2或BINATE IL-15或经CAR.GD2修饰的BINATE IL-2或经CAR.GD2修饰的BINATE IL-15共培养后,来自共培养物的残留肿瘤的百分比数据。对照中残留肿瘤测量值为100%。BINATE IL-2和BINATE IL-15均显示出明显的肿瘤杀伤力。经CAR.GD2修饰的BINATE IL-2和BINATE IL-15也显示出明显的杀伤力。

[0346] 表8-与BINATE细胞和BINATE.CAR.GD2细胞共培养后的残留肿瘤细胞

	<b>BINATE IL-2</b>	<b>BINATE.CARGD2 IL-2</b>	<b>BINATE IL-15</b>	<b>BINATE.CARGD2 IL-15</b>
[0347] <b>SH-SY5Y</b>	47.53	41.1	8	18.85
<b>LAN-1</b>	43.5	5.5	14.7	15.9
<b>CHLA</b>	56.9	41.6	44.35	21.9
<b>IMR-32</b>	59.9	60.9	2.7	2.1

[0348] 实施例19:评估骨髓性白血病细胞系的体外杀伤

[0349] 在独立的实验中,评估了在用编码第三代CD123 CAR的逆转录病毒构建体转导激活的BINATE之后,长期共培养物中骨髓性白血病细胞系的体外杀伤。

[0350] 1. 在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ TCR细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有50ng/ml抗CD2 (OKT11) 和50ng/ml抗NKp46 (Bab281) 的组合(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0351] 2. 第5天,将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体在含有用于CD123嵌合抗原受体(CAR)的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6$ /ml的浓度置于人纤连蛋白包被的平板上。CD123构建体包含CD19受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0352] 3. 三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和10ng/ml IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-15进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0353] 4. 在20天培养扩增结束时,将BINATE细胞和BINATE.CAR123置于肿瘤共培养实验中历时7天或更多天。实验包括在6孔培养皿中以2ml培养基/培养孔、以1:1的效应物与靶标比率(即, $0.5 \times 10^6$ BINATE或BINATE.CAR123细胞(效应物)与 $0.5 \times 10^6$ 肿瘤细胞(靶标))培养。在不存在细胞因子的情况下进行肿瘤细胞和效应细胞的共培养。在第3-7天通过显微术和流式细胞术评估共培养。

[0354] BINATE.CD123细胞的转导效率为65%。共培养中评估的骨髓性白血病肿瘤细胞系包括THP1、MOLM3和OCI AML细胞系。数据包括肿瘤与未修饰的BINATE或BINATE.CAR.CD123

共培养后残留肿瘤的百分比。对照中残留肿瘤测量值为100%。由于最初的短期杀死后残留肿瘤的持续生长,BINATE细胞未能成功根除骨髓性白血病细胞。BINATE.CAR.123细胞能够在与THP1和MOLM3细胞系共培养时成功杀死肿瘤细胞并维持无肿瘤的培养,并且在OCI AML细胞系中大于70%的对照。

[0355] 实施例20:评估白血病细胞的体内杀伤

[0356] 在独立的实验中,评估了在用编码第二代CD19 CAR的逆转录病毒构建体转导激活的BINATE细胞之后,白血病细胞的体内杀伤。

[0357] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法和Miltenyi NK选择试剂盒对单核细胞进行NK富集。将NK和 $\gamma\delta$ T细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和500IU/ml IL-2的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有500ng/ml抗CD2抗体(克隆LT2,Miltenyi)和10ng/ml NKp46的组合(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0358] 2.第5天,将激活的群体在含有用于CD19嵌合抗原受体的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6$ /ml的浓度置于人纤连蛋白包被的平板上。CD19构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0359] 3.三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。在扩增结束时,将BINATE细胞洗涤并配制在PBS溶液中,以静脉内施用给小鼠。

[0360] 异种体内白血病模型

[0361] 对NOD/SCID IL-2R $\gamma$  null(NSG)异种移植小鼠输注DAUDI细胞,以体内评估CAR转导细胞的抗肿瘤作用。在符合国际、欧盟和国家伦理要求的条件下进行了小鼠实验,并得到了意大利卫生部的批准(N°88/2016-PR)。在第-3天,对NGS小鼠(5周大;美国杰克逊实验室)接种萤火虫荧光素酶标记的Daudi细胞(FF-Daudi)( $0.25 \times 10^6$ )。在第0天通过静脉内注射向小鼠注射 $50 \times 10^6$  BINATE细胞或BINATE.CAR19细胞,并每周进行生物发光成像(IVIS System,Perkin Elmer,USA)。

[0362] 在第0天将三剂BINATE细胞或BINATE.CD19细胞输入动物模型。非遗传修饰的BINATE细胞能够产生部分反应,并且小鼠存活至第42天。带有CAR.CD19的遗传修饰的BINATE细胞表现出剂量效应反应,其中最低剂量的 $1 \times 10^6$  BINATE细胞能够使动物的存活时间比未转导的动物长一周,但没有接受 $5 \times 10^6$ 或 $10 \times 10^6$  BINATE.CAR.CD19细胞的动物那么长。该模型每周两次接受IL-2皮下注射。与用CAR-T CD19基因修饰的 $\alpha\beta$ T细胞不同,这些动物一直活到第90天被处死为止,并且尽管施用了IL-2,也没有细胞因子释放综合征(CRS)或同种异体或异种反应性的证据,这支持了先天细胞的安全性得到提高。在第90天处死动物,并对组织评估外周血和肝中人CD45+细胞(BINATE)的存在,然后分别在每个组织中检查NK和 $\gamma\delta$ T子集的百分比。如图23所示,血液和组织中都存在BINATE细胞,证明了BINATE细胞群体在体内环境中的存活和扩增潜力。

[0363] 实施例21:评估实体瘤(神经母细胞瘤)的体内杀伤

[0364] 在独立的实验中,评估了在用编码第三代GD2 CAR的逆转录病毒构建体转导激活的BINATE细胞之后,实体瘤(神经母细胞瘤)的体内杀伤。

[0365] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha\beta$ T细胞去除。将得到的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和 $10\text{ng}/\text{ml}$  IL-15的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有 $50\text{ng}/\text{ml}$ 抗CD2(OKT11)和 $50\text{ng}/\text{ml}$ 抗Nkp46(Bab281)的组合(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0366] 2.第5天,将激活的 $\alpha\beta$ TCRneg细胞群体在含有用于GD2嵌合抗原受体的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度置于人纤连蛋白包被的平板上。GD2构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0367] 3.三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和 $10\text{ng}/\text{ml}$  IL-15的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6/\text{ml}$ )。每3天进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。在第20天,将细胞洗涤并配制在PBS中用于施用。

[0368] 异种体内神经母细胞瘤模型

[0369] 对NOD/SCID IL-2R  $\gamma$  null (NSG) 异种移植小鼠输注SH-SY5Y细胞,以体内评估CAR转导细胞的抗肿瘤作用。在符合国际、欧盟和国家伦理要求的条件下进行了小鼠实验,并得到了意大利卫生部的批准(N°88/2016-PR)。在第-3天,对NSG小鼠(5周大;美国杰克逊实验室)腹膜内接种萤火虫荧光素酶标记的SH-SY5Y细胞( $0.75 \times 10^6$ )。每隔一周通过腹膜内注射向小鼠注射 $30 \times 10^6$  BINATE细胞或BINATE.CARGD2细胞,共3剂,并每周进行生物发光成像(IVIS System,Perkin Elmer,USA)。

[0370] 非遗传修饰的BINATE细胞在第18天左右出现部分响应,清除了周围的肿瘤块,但小鼠随后出现了局部进展。带有CAR.CDGD2的遗传修饰的BINATE细胞表现出周围肿瘤块的明显清除,但不能杀死本地病灶。该模型每周两次接受IL-2皮下注射。

[0371] 实施例22:评估通过NK细胞的实体瘤(神经母细胞瘤)和ADCC抗体的体外杀伤

[0372] 在独立的实验中,评估了先天性NK细胞或先天性NK.CAR.GD2细胞对实体瘤(神经母细胞瘤)的体外杀伤。

[0373] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法和Miltenyi NK选择试剂盒对单核细胞进行NK富集。将得到的群体以 $0.25-0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞接种浓度置于使用BINATE培养基和 $500\text{IU}/\text{ml}$  IL-2的无饲养层的培养条件下的24孔板中,所述板具有 $500\text{ng}/\text{ml}$ 抗CD2抗体(克隆LT2,Miltenyi)和 $10\text{ng}/\text{ml}$  Nkp46的组合(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。

[0374] 2.第5天,将激活的群体在含有用于GD2嵌合抗原受体(CAR)的构建体的 $\gamma$ 逆转录病毒上清液的存在下,以 $0.25 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度置于人纤连蛋白包被的平板上。GD2构建体包含CD34受体的突变片段作为选择和跟踪标志物。

[0375] 3.三天后,将转导的细胞洗涤,并在使用BINATE培养基和500IU/mL IL-2的无饲养层的培养条件下,以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度在T75烧瓶中进一步培养扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。对于平板或烧瓶而言,每3天用新鲜的BINATE培养基和IL-2进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0376] 4.在20天培养扩增结束时,将BINATE细胞和BINATE.CARGD2细胞置于肿瘤共培养实验中历时7天或更多天。实验包括在6孔培养皿中以2ml培养基/培养孔、以1:1的效应物与靶标比率(即, $0.5 \times 10^6$ 先天性NK或先天性NK.CAR.GD2(效应物)与 $0.5 \times 10^6$ SH-SY5Y肿瘤细胞(靶标))培养。将抗GD2抗体(10 $\mu$ g 14.G2a单克隆抗体)添加到每个共培养组中,以评估激活细胞的ADCC潜力。在不存在细胞因子的情况下进行肿瘤细胞和效应细胞的共培养。在第3-7天通过显微术和流式细胞术评估共培养。

[0377] 数据包括在有或没有14.G2a ADCC抗体的情况下,将肿瘤与未修饰的先天性NK或先天性NK.CAR.GD2共培养后,残留肿瘤的百分比。对照中残留SH-SY5Y肿瘤细胞的测量值为99.5%。当将14.G2a抗体添加到SH-SY5Y肿瘤细胞中时,与对照(98.5%)相比没有差异。当将未修饰的激活的先天性NK细胞添加到SH-SY5Y肿瘤细胞中时,残留肿瘤为22%。向先天性NK细胞和SH-SY5Y肿瘤细胞的组合中添加14G.2a抗体得到较小的残留肿瘤百分数(14.5%)。将先天性NK.CAR.GD2细胞添加到SH-SY5Y肿瘤细胞中得到40.9%的残留肿瘤百分比,并且当先天性NK.CAR.GD2细胞、SH-SY5Y肿瘤细胞和14.G2a抗体共培养时,残留肿瘤百分比降至8.7%。在具有Fc $\gamma$  III受体表达的细胞(例如激活的先天细胞)存在下,抗体的ADCC活性增强了肿瘤杀伤力。

[0378] 实施例23:

[0379] 在独立的实验中,评估了扩增过程中转换细胞因子对细胞含量的影响。

[0380] 1.在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离。

[0381] 2.使用研究规模的Miltenyi LS柱分离法对单核细胞进行 $\alpha$  $\beta$ T细胞去除。

[0382] 3.将得到的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体置于使用补充了5%AB血清的NK MACS™培养基(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))的无饲养层的培养条件下(或者,可以使用其他培养基,例如R&D systems培养基、CELLGENIX培养基等)。

[0383] 4.通过Caprico纯化的GMP的10ng/ml抗NKp46(克隆Bab 281)和10ng/ml抗CD2(克隆OKT11)或50ng/ml抗NKp46(克隆Bab 281)和50ng/ml抗CD2(克隆OKT11)的组合实现激活(或者,可以使用其他浓度的激活剂,并且可以添加其他试剂用于激活)。将激活的 $\alpha$  $\beta$ TCRneg细胞群体以 $0.25 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度于具有以下条件之一的24孔板中,于使用补充了5%AB血清的NK MACS™培养基(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))的无饲养层的培养条件下培养扩增(或者,可以使用其他培养基,例如R&D systems培养基、CELLGENIX培养基等):

[0384] a. 500IU/mL人白细胞介素2(IL-2)(Miltenyi Biotec)

[0385] b. 10ng/ml人白细胞介素15(IL-15)(Miltenyi Biotec)

[0386] c. 500IU/mL IL-2和10ng/mL IL-15的组合

[0387] d. 500IU/mL IL-2和10ng/ml OKT3的组合(Miltenyi Biotec)

[0388] e. 10ng/mL IL-15和500IU/mL IL-2和10ng/ml OKT3的组合然后转移到T75烧瓶中。

[0389] 5. 每3天用新鲜的培养基(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))以及以上所列的条件之一进行培养基更换。

[0390] 6. 将细胞以 $0.25-0.5 \times 10^6$ /ml的浓度接种(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器例如生物反应器(G-Rex)中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。

[0391] 7. 另外,然后洗涤在前25天里用IL-2最初扩增的细胞并补充IL-15直到培养结束(第30天)。在第25天洗涤用IL-15最初扩增的细胞,然后补充IL-2,直到第30天培养结束(称为细胞因子转换条件)。在一些情况下,然后洗涤在前20天里用IL-2最初扩增的细胞并补充IL-15直到培养结束(第30天)。在第20天洗涤用IL-15最初扩增的细胞,然后补充IL-2直到第30天培养结束。可以在转换条件下使用替代组合或其他细胞因子,例如IL-7、IL-12、IL-18、IL-21、OKT3、OKT11和抗NCR。

[0392] 8. 在扩增结束时,分析BINATE细胞的NK和 $\gamma \delta$ CD3+ T细胞含量,并通过流式细胞术通过受体在细胞上的表达来表征。

[0393] 在该实施例中,当将单一细胞因子与转换条件(IL-2对比IL-2转换至IL-15)进行比较时,在IL-2对比IL-2/IL-15的情况下,添加IL-15时的 $\gamma \delta$ T细胞的数目与单独使用IL-2相比增加(分别为70%对比50%)。在IL-15对比IL-15/IL-2的情况下,在转换条件下的NK群体与单独使用IL-15相比增加(分别为90%对比80%)。由于IL-2和IL-15均通过与细胞上的IL-2受体相互作用而起作用,因此数据表明,通过转换到其他细胞因子,在使用特定细胞因子的初始扩增条件下有利的群体扩增得到增强。

[0394] 实施例24:分离纯NK细胞或纯 $\gamma \delta$ T细胞

[0395] 在该实施例中,描述了分离纯NK细胞群体和分离纯 $\gamma \delta$ T细胞群体的方法。图24中显示了说明此方法的示例变体的流程图。

[0396] 1. 在离心机中通过手动分离对来自正常健康供体的血沉棕黄层进行Ficoll™梯度细胞分离;也可以使用Percoll梯度、SEPAx、Cobe 2991或淘析系统。或者,可以使用单采血液成分法、脐带血单位、骨髓或诸如腹水、CSF或胸膜液的体液作为经过或未经梯度离心的细胞来源。

[0397] 2. 单核细胞可直接使用或在梯度分离后使用,或进行进一步的细胞选择,例如Ficoll™MNC、抗体去除、NK阳性选择、NK阴性选择、 $\gamma \delta$ T细胞阴性选择和/或CD3+阳性选择。在某些情况下,使用基于Miltenyi磁珠的技术或其他细胞选择技术对单核细胞进行CD56+ NK细胞阳性选择或阴性选择。或者,可以使用基于Miltenyi磁珠的技术或其他细胞选择技术对细胞进行 $\gamma \delta$ TCR+阳性选择。或者,可以使用基于Miltenyi磁珠的技术或其他细胞选择技术对细胞进行CD3+细胞去除。

[0398] 3. 然后在可溶性或交联抗LFA和抗NCR抗体的存在下,在有或没有人血清补充物的情况下,在无饲养层的培养中激活得到的细胞群体,所述培养使用BINATE培养基(补充有5% AB血清的NK MACS™培养基#130-107-879Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA(或者,可以使用其他培养基,例如R&D systems培养基、CELLGENIX培养基等))或其他不含动物组分的培养基,例如体内或R&D Systems或Cellgenix。

[0399] 4. 在T75烧瓶中以 $0.25-5 \times 10^6$ /ml的细胞接种浓度,通过补充例如IL-2、IL-15、

IL-12、IL-18及其组合的细胞因子来发生细胞扩增(或者,细胞接种浓度在培养袋、烧瓶或其他大型培养容器(例如生物反应器(G-Rex))中的范围可高达 $1 \times 10^6$ /ml)。每3天用生长培养基和细胞因子进行培养基更换(对于生物反应器而言,更换频率较低(5-7天))。

[0400] 5. 在第7、20、30、45和60天得到的培养物可以包含NK和 $\gamma \delta$ T细胞的混合物的BINATE群体,然后将其冷冻保存以进行给药。或者,所得细胞群体可经历进一步的扩增后细胞选择步骤,例如NK CD56<sup>+</sup>去除以得到纯 $\gamma \delta$ T细胞群体。或者,可对细胞进行 $\gamma \delta$ T细胞的阳性去除或阴性选择,产生纯NK群体,或进行CD16的阳性选择,这将产生高度富集的ADCC FcyIII受体<sup>+</sup>群体。或者,可对细胞进行NK去除,然后对ADCC $\gamma \delta$ T细胞群体进行CD16选择。

[0401] 实施例25:逆转录病毒构建体

[0402] 在该实施例中,描述了在以上某些实施例中使用的逆转录病毒载体CARGD2、CARCD123和CARCD19。

[0403] 载体骨架

[0404] 下文所述的构建体包括SFG骨架,其使用基于莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)的逆转录病毒载体。除包装序列(psi)外,所有env和gag-pol均已去除。因此,所述载体不能复制。

[0405] 生产细胞系

[0406] 在OPBG的儿科肿瘤细胞和基因疗法实验室,在研究环境中,使用专用层流罩和CO<sub>2</sub>培养箱以及非动物来源的材料( $\gamma$ 辐射的Pharmagrade FBS (EuroClone,目录号ECS0172L,批号EUS0131906GI)除外)产生了用于生产以下逆转录病毒构建体的包装细胞系。从由BioVec Pharma获得的基于cGMP库人的293VEC RD114生产细胞产生了包装细胞系。特别地,选择293VEC RD114细胞作为包装细胞系,因为它们是人类起源的,并允许产生适合大规模临床等级生产的高载体滴度。

[0407] CARGD2

[0408] 在Ospedale Pediatrico Bambino Gesù(OPBG)的“儿科肿瘤细胞和基因疗法”实验室构建了iC9-CARGD2.CD28.41bb.CD3zeta(OPBG-91载体)逆转录病毒载体。使用双顺反子载体,其允许同时表达两个转基因,即诱导型半胱天冬蛋白酶9(iC9)和CARGD2(iC9-CARGD2.CD28.41bb.CD3zeta)。进行单细胞克隆,并扩增产生最高滴度(使用PCR分析上清液中的载体存在)的293VEC RD114克隆(即OPBG-91-7),将其保存在Officina Farmaceutica OPBG中,并用于在测试无菌性和支原体后,在cGMP条件下产生逆转录病毒。

[0409] 在iC9组分中,将在细胞内表达的Casp9蛋白的催化结构域与衍生自具有F36V突变的人FK506结合蛋白(FKBP12)的药物结合结构域融合。在包括iC9序列基因盒之后,将CAR分子克隆至逆转录病毒载体中以改善该方法的安全性方面,所述CAR分子基于对人抗原GD2具有特异性的单克隆抗体14.G2A的融合VH-VL区的单链,并且与CD28跨膜结构域及其内结构域——4.1bb共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 细胞质结构域同框,用于在抗原结合后转导激活信号。

[0410] 用于iC9.CARGD2.CD28.41bb.CD3z表达和活性的某些功能和结构组分总结在下表9中,并在此处列出:

- [0411] • 5'LTR-在载体5'末端的逆转录病毒长末端重复序列(作为启动子序列起作用)。
- [0412] •  $\psi$ -逆转录病毒衣壳化信号(psi;将RNA包装到病毒颗粒中所必需的)。
- [0413] • SA-剪接受体位点。
- [0414] • iCasp9-诱导型半胱天冬蛋白酶-9表达盒。iCasp9由具有F36V突变的人FK506结

合蛋白 (FKBP12) 构成, 所述结合蛋白通过6个氨基酸的Gly-Ser接头与修饰的CARD结构域缺失的人半胱天冬蛋白酶-9连接。

[0415] • FKBP12-F36V-包含F36V突变的工程FK506结合蛋白, 用于优化对AP1903的结合亲和力。FKBP12-F36V蛋白结构域用作连接的治疗蛋白的药物结合/寡聚结构域。FKBP12-F36V充当半胱天冬蛋白酶-9的调节剂。在没有AP1903的情况下, iCasp9具有最低活性; 与FKBP12-F36V结合的AP1903促进二聚化, 并使两个半胱天冬蛋白酶-9分子并置以启动凋亡。因此, FKBP12-F36V部分在功能上替代了介导Apaf-1相关寡聚的半胱天冬蛋白酶-9的内源性二聚化/激活模块(半胱天冬蛋白酶激活和募集结构域; CARD)。

[0416] • 接头-合成Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly肽接头, 用于将开关调节序列与半胱天冬蛋白酶-9融合。

[0417] • 半胱天冬蛋白酶-9-人半胱天冬蛋白酶-9cDNA序列(关键的促凋亡调节剂) 和构建体的治疗成分(受调节的自杀基因)。缺失了内源性二聚化/激活模块(半胱天冬蛋白酶激活和募集结构域; CARD), 以减少自发的Apaf1结合, 从而减少背景杀伤。

[0418] • 2A-编码来自明脉扁刺蛾(Thata Asigna) 昆虫病毒的20个氨基酸的合成肽, 其作为半胱天冬蛋白酶-9蛋白和CAR蛋白之间的可裂解接头起作用。

[0419] • 信号肽-短的氨基酸序列, 可使分泌蛋白从内质网正确转移到细胞膜。

[0420] • CAR-CAR分子基于对人抗原GD2具有特异性的单克隆抗体14.G2A的融合VH-VL区的单链, 与CD28 TM和共刺激结构域——4.1bb共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 细胞质结构域同框。

[0421] • 3'LTR-在载体3'末端的逆转录病毒长末端重复序列(作为终止子/聚腺苷酸化序列的起作用)。

[0422] 表9

[0423]

组分	开始	结束
LTR	1	590
iCasp9盒	1880	3085
FKBP12-F36V	1880	2218
接头肽	2219	2236
Casp9	2237	3085
2A肽	3086	3145
CAR	3146	4723
信号肽	3146	3208
scFv	3209	4000
CH2-CH3铰链	4001	4055
CD28TM	4056	4135
CD28共刺激	4136	4258
4.1bb共刺激	4259	4384
CD3 $\zeta$	4385	4723
LTR	4896	5485
Amp <sup>R</sup> 标志物	6780	7640

[0424] 通过组合载体构建体各组分的DNA序列文件, 组装参考电子载体序列。由于逆转录



病毒基因组是基于RNA的,因此对用于转染到293VEC细胞系中的质粒DNA进行了序列分析(逆转录病毒产品制备的初始步骤)。在Ospedale Pediatrico Bambino Gesù对整个OPBG-91载体进行双向测序。使用SnapGene软件组装测序运行。与理论参考电子序列相比,未鉴别到碱基不匹配。

[0425] CARCD123

[0426] 在Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG) 的“儿科肿瘤细胞和基因疗法”实验室构建了 $\Delta$  CD19-2A-CAR-CD123- $\Delta$  CD34.CD8.41bb.CD3zeta (OPBG-242载体) 逆转录病毒载体。使用双顺反子载体,其允许同时表达两个转基因,即 $\Delta$  CD19和CARCD123 ( $\Delta$  CD19-2A-CAR-CD123- $\Delta$  CD34.CD8.41bb.CD3zeta)。如上所述进行单细胞克隆,并扩增和保存产生最高滴度(使用PCR分析上清液中的载体存在)的克隆。

[0427]  $\Delta$  CD19代表与跨膜部分连接的人CD19的胞外结构域。它具有双重功能,可帮助遗传修饰的细胞的选择和表型表征。在包括 $\Delta$  CD19的序列的基因盒之后,通过使用2A序列将CAR分子克隆至逆转录病毒载体中,所述CAR分子是基于对人抗原CD123具有特异性的单克隆抗体7G3的融合VH-VL区的单链,并且与CD8跨膜结构域及其内结构域——4.1bb共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 细胞质结构域同框,用于在抗原结合后转导激活信号。

[0428] 用于 $\Delta$  CD19-2A-CAR-CD123- $\Delta$  CD34.CD8.41bb.CD3z表达和活性的某些功能和结构组分总结在下表10中,并在此处列出:

[0429] • 5'LTR-在载体5'末端的逆转录病毒长末端重复序列(起启动子序列的作用)。

[0430] •  $\psi$ -逆转录病毒衣壳化信号( $\psi$ ;将RNA包装到病毒颗粒中所必需的)。

[0431] • SA-剪接受体位点。

[0432] •  $\Delta$  CD19-包括优化的人类细胞外和跨膜结构域。

[0433] • 2A-编码来自明脉扁刺蛾昆虫病毒的20个氨基酸的合成肽。

[0434] • 信号肽-短的氨基酸序列,可使分泌蛋白从内质网正确转移到细胞膜。

[0435] •  $\Delta$  CD34-包括衍生自人CD34的短肽,有助于在转导后检测CAR+T细胞。

[0436] • CAR-CAR分子基于对人抗原CD123具有特异性的单克隆抗体7G3的融合VH-VL区的单链,与CD8 TM和共刺激结构域——4.1bb共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 细胞质结构域同框。

[0437] • 3'LTR-在载体3'末端的逆转录病毒长末端重复序列(起终止子/聚腺苷酸化序列的作用)。

[0438] 表10

[0439]

组分	开始	结束
LTR	397	990
dCD19	2282	3280
SvFv 7G3	3404	3745
2A肽	3746	3769
SvFv 7G3	3770	4123
$\Delta$ CD34	4124	4183
CD8茎	4184	4309
CD8TM	4310	4372
CD8 Cyt	4373	4420

4.1bb共刺激	4427	4552
CD3 $\zeta$	4553	4891
3' LTR	5069	5635
AmpR启动子	6848	6952
AmpR	6953	7813

[0440] 通过组合载体构建体各组分的DNA序列文件,组装参考电子载体序列。由于逆转录病毒基因组是基于RNA的,因此对用于转染到293VEC细胞系中的质粒DNA进行了序列分析(逆转录病毒产品制备的初始步骤)。在Ospedale Pediatrico BambinoGesù对整个OPBG-242载体进行双向测序。使用SnapGene软件组装测序运行。与理论参考电子序列相比,未鉴别到碱基不匹配。

[0441] CARCD19

[0442] 治疗性逆转录病毒构建体SFG-iC9-Car.CD19.41bb编码合成的配体诱导型人半胱天冬蛋白酶-9cDNA,所述cDNA与对鼠抗原CD19,4.1bb共刺激结构域具有特异性的单克隆抗体的融合VH-VL区的单链连接。组装体与上述CARGD2相同,除了是第二代。在欧盟细胞和基因疗法实验室(EU Cell and Gene Therapy Laboratory)构建了逆转录病毒载体。进行单细胞克隆,并扩增产生最高滴度的克隆(使用PCR分析上清液中的载体存在),将其保存在cGMP设施中,并用于在测试无菌性和支原体后,在cGMP条件下产生逆转录病毒。

[0443] 此处列出了用于SFG-iC9-Car.CD19.41bb表达和活性的某些功能和结构组件:

[0444] • 5'LTR-在载体5'末端的逆转录病毒长末端重复序列(起启动子序列的作用)。

[0445] •  $\psi$ -逆转录病毒衣壳化信号(psi;将RNA包装到病毒颗粒中所必需的)。

[0446] • SA-剪接受体位点。

[0447] • iCasp9-诱导型半胱天冬蛋白酶-9表达盒。iCasp9由具有F36V突变的人FK506结合蛋白(FKBP12)构成,所述结合蛋白通过6个氨基酸的Gly-Ser接头与修饰的CARD结构域缺失的人半胱天冬蛋白酶-9连接。

[0448] • FKBP12-F36V-包含F36V突变的工程FK506结合蛋白,用于优化对AP1903的结合亲和力。FKBP12-F36V蛋白结构域用作连接的治疗蛋白的药物结合/寡聚结构域。FKBP12-F36V充当半胱天冬蛋白酶-9的调节剂。在没有AP1903的情况下,iCasp9具有最小的活性;与FKBP12-F36V结合的AP1903促进二聚化,并使两个半胱天冬蛋白酶-9分子并置以启动凋亡。因此,FKBP12-F36V部分在功能上替代了介导Apaf-1相关寡聚的半胱天冬蛋白酶-9的内源性二聚化/激活模块(半胱天冬蛋白酶激活和募集结构域;CARD)。

[0449] • 接头-合成Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly肽接头,用于将开关调节序列与半胱天冬蛋白酶-9融合。

[0450] • 半胱天冬蛋白酶-9-人半胱天冬蛋白酶-9cDNA序列(关键的促凋亡调节剂)和构建体的治疗成分(受调节的自杀基因)。缺失了内源性二聚化/激活模块(半胱天冬蛋白酶激活和募集结构域;CARD),以减少自发的Apaf1结合,从而减少背景杀伤。

[0451] • 2A-编码来自明脉扁刺蛾(Thata A signa)昆虫病毒的20个氨基酸的合成肽,其作为半胱天冬蛋白酶-9蛋白和CAR蛋白之间的可裂解接头。

[0452] • 信号肽-短的氨基酸序列,可使分泌蛋白从内质网正确转移到细胞膜。

[0453] • CAR-CAR分子基于对鼠抗原CD19,4.1bb共刺激结构域具有特异性的单克隆抗体

的融合VH-VL区的单链。

[0454] • 3'LTR-在载体3'末端的逆转录病毒长末端重复序列(起终止子/聚腺苷酸化序列的作用)。

[0455] 实施例26:某些非限制性实施方案的实施例

[0456] 以下列出的是本技术的某些实施方案的非限制性实施例。

[0457] A1.一种用于制造包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物的方法,其包括:

[0458] 从一个或多个受试者获得包含细胞的样品;

[0459] 在产生包含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的去除细胞群体的条件下从所述样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞;和

[0460] 使所述去除细胞群体暴露于激活条件,包括使所述去除细胞群体与以下多肽接触:(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至不同于所述细胞粘附多肽的多肽并在样品群体的一个或多个细胞的表面上表达的外源多肽;和

[0461] 使所述去除细胞群体暴露于扩增条件,包括使所述去除细胞群体与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。

[0462] A1.1.一种用于制造包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物的方法,其包括:

[0463] 从一个或多个受试者获得包含细胞的样品;

[0464] 使所述样品暴露于激活条件,包括使所述样品与以下多肽接触:(a)至少一种免疫特异性结合至细胞粘附多肽的外源多肽,和(b)至少一种免疫特异性结合至不同于所述细胞粘附多肽的多肽并在样品群体的一个或多个细胞的表面上表达的外源多肽,其中(a)或(b)是可溶的,或者(a)和(b)都是可溶的;和

[0465] 使所述样品暴露于扩增条件,包括使所述样品与至少一种补充多肽接触,从而产生包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。

[0466] A2.实施方案A1或A1.1的方法,其中选择所述至少一种补充多肽,使得所述群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的量而言,NK细胞的量取决于所述至少一种补充多肽的量和/或类型。

[0467] A2.1.实施方案A1、A1.1或A2的方法,其中在使所述去除细胞群体与所述至少一种补充多肽接触之后,所述至少一种补充多肽增加或减少细胞群体中相对于 $\gamma$ . $\delta$ T细胞而言的NK细胞的量。

[0468] A3.实施方案A1、A1.1、A2或A2.1中任一项的方法,其中所述激活条件不含来自非人类动物的血清。

[0469] A4.实施方案A1至A3中任一项的方法,其中所述扩增条件不含来自非人类动物的血清。

[0470] A5.实施方案A1至A4中任一项的方法,其中所述激活条件不含饲养细胞。

[0471] A6.实施方案A1至A5中任一项的方法,其中所述扩增条件不含饲养细胞。

[0472] A7.实施方案A1至A6中任一项的方法,其中所述样品选自外周血、肝组织、上皮组织、骨髓和脐带血。

[0473] A8.实施方案A7的方法,其中所述样品是外周血。

- [0474] A9. 实施方案A8的方法, 其中外周血样品是处理过的样品。
- [0475] A10. 实施方案A7的方法, 其中所述样品是脐带血。
- [0476] A11. 实施方案A10的方法, 其中脐带血样品是处理过的样品。
- [0477] A12. 实施方案A1至A11中任一项的方法, 其中 (b) 中的所述外源多肽免疫特异性结合至NK细胞激活受体、 $\gamma$ . $\delta$ T细胞激活受体或两者。
- [0478] A13. 实施方案A12的方法, 其中所述受体是NKp30、NKp44或NKp46。
- [0479] A14. 实施方案A13的方法, 其中所述受体是NKp46。
- [0480] A15. 实施方案A1至A14中任一项的方法, 其中 (a) 中的所述外源多肽免疫特异性结合至CD2。
- [0481] A16. 实施方案A1至A15中任一项的方法, 其中 (a) 或 (b) 或者 (a) 和 (b) 中的所述外源多肽是抗体或其抗原结合片段。
- [0482] A17. 实施方案A1至A16中任一项的方法, 其中 (a) 或 (b) 中的至少一者是可溶的。
- [0483] A17.1. 实施方案A1至A17中任一项的方法, 其中 (a) 和 (b) 中的所述外源多肽都是可溶的。
- [0484] A18. 实施方案A1至A16中任一项的方法, 其中 (a) 中的所述外源多肽或 (b) 中的所述外源多肽结合至底物。
- [0485] A19. 实施方案A1至A18中任一项的方法, 其中所述激活条件包括使所述样品或去除细胞群体与至少两种外源多肽接触。
- [0486] A20. 实施方案A19的方法, 其中所述第一外源多肽免疫特异性结合至CD2, 并且所述第二外源多肽免疫特异性结合至NKp46。
- [0487] A21. 实施方案A19或A20的方法, 其中所述第一外源多肽和/或所述第二外源多肽是抗体或其抗原结合片段。
- [0488] A22. 实施方案A1至A21中任一项的方法, 其中所述激活条件的多肽组分基本上由或由以下组成:
- [0489] (a) 免疫特异性结合至细胞粘附多肽CD2的外源多肽; 和
- [0490] (b) 与 (a) 中的所述外源多肽不同并且免疫特异性结合至NKp46的外源多肽。
- [0491] A23. 实施方案A1至A22中任一项的方法, 其中所述补充多肽是细胞因子和/或与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽。
- [0492] A24. 实施方案A23的方法, 其中所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与至少一种补充多肽接触, 所述补充多肽是细胞因子, 并且任选地是与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的补充多肽。
- [0493] A25. 实施方案A24的方法, 其中所述细胞因子是白细胞介素 (IL)。
- [0494] A26. 实施方案A23至A25中任一项的方法, 其中所述至少一种补充多肽包括IL-2、IL-4、IL-15或其任何组合。
- [0495] A27. 实施方案A23至A26中任一项的方法, 其中所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与以下多肽接触:
- [0496] (a) IL-2多肽, 和任选地, 与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽;
- [0497] (b) IL-15多肽; 或
- [0498] (c) IL-2多肽和IL-15多肽, 和任选地, 与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多

肽。

[0499] A28. 实施方案A23至A27中任一项的方法, 其中所述  $\gamma$  . $\delta$ T细胞上的所述受体是CD3。

[0500] A29. 实施方案A23至A28中任一项的方法, 其中与  $\gamma$  . $\delta$ T细胞上的受体免疫特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。

[0501] A30. 实施方案A29的方法, 其中所述扩增条件包括使所述样品与以下多肽接触:

[0502] (a) IL-2多肽;

[0503] (b) IL-15多肽;

[0504] (c) IL-2多肽和IL-15多肽;

[0505] (d) IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体; 或

[0506] (e) IL-2多肽、IL-15多肽和免疫特异性结合CD3的抗体。

[0507] A31. 实施方案A30的方法, 其中所述免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

[0508] A32. 实施方案A1至A31中任一项的方法, 其中所述激活条件和扩增条件同时执行或以任何顺序依次执行。

[0509] A33. 实施方案A1至A32中任一项的方法, 其中:

[0510] 所述至少一种外源多肽还可以起补充多肽的作用; 或

[0511] 所述至少一种补充多肽还可以起外源多肽的作用; 或

[0512] 所述至少一种外源多肽还可以起补充多肽的作用, 并且所述至少一种补充多肽还可以起外源多肽的作用。

[0513] A34. 实施方案A30至A33中任一项的方法, 其中:

[0514] (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-2多肽接触; 和

[0515] (ii) 所得的富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的  $\gamma$  . $\delta$ T细胞。

[0516] A35. 实施方案A30至A33中任一项的方法, 其中:

[0517] (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-15多肽接触; 和

[0518] (ii) 所得的富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约80-99%的NK细胞和约1-20%的  $\gamma$  . $\delta$ T细胞。

[0519] A36. 实施方案A30至A33中任一项的方法, 其中:

[0520] (i) 所述扩增条件包括使所述样品或去除细胞群体与IL-2多肽和免疫特异性结合CD3的抗体接触; 和

[0521] (ii) 所得的富含NK细胞和  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的细胞群体包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的  $\gamma$  . $\delta$ T细胞。

[0522] A37. 实施方案A1至A36中任一项的方法, 其中所述扩增条件包括:

[0523] 使所述样品或去除细胞群体与包括一种或多种补充多肽的第一组条件接触, 从而产生包括第一比率的NK细胞与  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的第一细胞群体; 和

[0524] 使所述第一细胞群体与包括一种或多种补充多肽的第二组条件接触, 从而产生包括期望最终比率的NK细胞与  $\gamma$  . $\delta$ T细胞的第二细胞群体, 其中所述第一组条件与所述第二组条件不同。

[0525] A38. 实施方案A37的方法, 其中在与所述第二组条件接触之前洗涤所述第一细胞

群体。

[0526] A39.实施方案A37或A38的方法,其中:

[0527] 所述第一组条件包括IL-2,并且所述第二组条件包括IL-15;

[0528] 所述第一组条件包括IL-15,并且所述第二组条件包括IL-2;

[0529] 所述第一组条件包括IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体,并且所述第二组条件包括IL-15;或

[0530] 所述第一组条件包括IL-15和免疫特异性结合CD3的抗体,并且所述第二组条件包括IL-2和免疫特异性结合CD3的抗体。

[0531] A40.实施方案A39的方法,其中所述免疫特异性结合CD3的抗体是OKT3。

[0532] A41.实施方案A1.1和A2至A40中任一项的方法,进一步包括:

[0533] 在将所述样品暴露于激活和扩增条件之前,从所述样品中去除 $\alpha$ . $\beta$ T细胞,从而产生去除细胞群体;和

[0534] 使所述去除细胞群体经历激活和扩增条件,从而获得包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体的组合物。

[0535] A41.1.实施方案A1至A41中任一项的方法,其中在激活和扩增之前,所述样品或所述去除细胞群体不暴露于选择NK细胞或 $\gamma$ . $\delta$ T细胞或去除除 $\alpha$ - $\beta$ T细胞以外的细胞的条件。

[0536] A41.2.实施方案A41.1的方法,其中在激活和扩增之前,所述样品或所述去除细胞群体不暴露于去除CD3+细胞的条件。

[0537] A42.实施方案A1至A41.1中任一项的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后不包含外源核酸。

[0538] A43.实施方案A1至A41.1中任一项的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后不包含编码肿瘤坏死因子受体、嵌合抗原受体(CAR)、髓样分化初级反应蛋白或先天免疫信号转导适配体的外源核酸。

[0539] A44.实施方案A1至A43中任一项的方法,其中所述样品或去除细胞群体的细胞在激活和扩增之前、期间或之后未被遗传修饰。

[0540] A45.实施方案A1至A44中任一项的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体进行处理,从而去除所述 $\gamma$ . $\delta$ 细胞,并且所得群体基本上由或由NK细胞组成。

[0541] A46.实施方案A1至A44中任一项的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体进行处理,从而去除所述NK细胞,并且所得群体基本上由或由 $\gamma$ . $\delta$ T细胞组成。

[0542] A47.实施方案A1至A45中任一项的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体进行针对NK细胞的阳性选择,从而获得基本上由或由NK细胞组成的细胞群体。

[0543] A48.实施方案A1至A44和A46中任一项的方法,其进一步包括对富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体进行针对 $\gamma$ . $\delta$ 细胞的阳性选择,从而获得基本上由或由 $\gamma$ . $\delta$ 细胞组成的细胞群体。

[0544] A49.实施方案A1至A48中任一项的方法,其中所述扩增条件包括将所述样品或去除细胞群体在无饲养细胞的培养基中孵育约一周至约10周,由此获得包含富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体的组合物。

[0545] A50.实施方案A49的方法,其中培养条件包括将所述样品或去除细胞群体在无饲养细胞的培养基中孵育约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、

45、50、55或60天或更长时间,或约2、3、4、5、6、7、8、9或10周。

[0546] A51.实施方案A1至A50中任一项的方法,其中富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体在所述扩增条件下在30天内扩增大于约2log。

[0547] A52.实施方案A51的方法,其中所述细胞群体在所述扩增条件下在30天内扩增大于约3log。

[0548] A53.实施方案A1至A52中任一项的方法,其中富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。

[0549] A54.实施方案A1至A53中任一项的方法,其中在所述扩增条件下在60天后,富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体不含耗尽的细胞。

[0550] A55.实施方案A1至A54中任一项的方法,其中在富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的扩增细胞群体中,少于5%、4%、3%或2%的NK细胞包含PD-1标志物,和/或所述扩增群体中总细胞或所述扩增群体中 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的约20%、15%、10%或更少包含PD-1标志物。

[0551] A56.实施方案A1至A55中任一项的方法,其中富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含作为所述群体中细胞总数的百分比的一种或多种以下激活标志物,:

[0552] (a) 90%或更高的KIR5;

[0553] (b) 10%或更高的SIGLEC-7;

[0554] (c) 60%或更高的KIR3D51;

[0555] (d) 10%或更高的KIR2DL1;

[0556] (e) 25%或更高的NKp30、NKp44或NKp46;

[0557] (f) 35%或更多的NKG2D;

[0558] (g) 90%或更多的DNAM1;

[0559] (h) 85%或更多的NTBA;

[0560] (i) 95%或更高的CD2;和

[0561] (j) 55%或更高的KIR3DS1。

[0562] A57.实施方案A1至A56中任一项的方法,其中富含NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的细胞群体包含80%或更多的先天免疫细胞。

[0563] A58.实施方案A57的方法,其中约70%至约100%,或至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞是CD56+。

[0564] A59.实施方案A57或A58的方法,其中约10%至约40%,或至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞是CD16+。

[0565] A60.实施方案A57至A59中任一项的方法,其中少于10%、少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的细胞是CD57+。

[0566] A61.实施方案A1至A60中任一项的方法,其中所述样品或去除细胞群体在激活和扩增期间或之后不包含CD4+CD8+细胞。

[0567] A62.实施方案A1至A61中任一项的方法,其中所述激活条件和所述扩增条件不包

括双膦酸盐。

[0568] A63. 实施方案A62的方法,其中所述双膦酸盐是帕米膦酸盐或唑来膦酸盐。

[0569] A64. 实施方案A1至A63中任一项的方法,其中所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。

[0570] A65. 实施方案A64的方法,其中所述多克隆 $\gamma$ . $\delta$ T细胞包含至少一个选自V. $\delta$ .1+和V. $\delta$ .1-的亚群和至少一个选自V. $\delta$ .2+和V. $\delta$ .2-的亚群。

[0571] A66. 一种可通过或通过实施方案A1至A65中任一项的方法获得的组合物。

[0572] B1. 一种包含修饰的外周血细胞群体的组合物,其中所述群体包含:

[0573] 多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;

[0574] 去除了 $\alpha$ . $\beta$ T细胞;和

[0575] 不含饲养细胞。

[0576] B2. 实施方案B1的组合物,其中:

[0577] 约25%至约45%的细胞是NK细胞,并且约55%至约75%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;

[0578] 约25%至约30%的细胞是NK细胞,并且约70%至约75%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;

[0579] 约80%至约99%的细胞是NK细胞,并且约1%至约20%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞;或

[0580] 约40%至约45%的细胞是NK细胞,并且约55%至约60%的细胞是 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0581] B3. 实施方案B1或B2的组合物,其中30%或更多的细胞被激活。

[0582] B4. 实施方案B1至B3中任一项的组合物,其中修饰的细胞群体包含作为所述群体中细胞总数的百分比的一种或多种以下激活标志物:

[0583] (a) 90%或更高的KIR5;

[0584] (b) 10%或更高的SIGLEC-7;

[0585] (c) 60%或更高的KIR3D51;

[0586] (d) 10%或更高的KIR2DL1;

[0587] (e) 25%或更高的NKp30、NKp44或NKp46;

[0588] (f) 35%或更多的NKG2D;

[0589] (g) 90%或更多的DNAM1;

[0590] (h) 85%或更多的NTBA;

[0591] (i) 95%或更高的CD2;和

[0592] (j) 55%或更高的KIR3DS1。

[0593] B5. 实施方案B1至B4中任一项的组合物,其中被修饰的群体包含80%或更多的先天免疫细胞。

[0594] B6. 实施方案B1至B5中任一项的组合物,其中被修饰的群体富含激活的细胞毒性细胞,其为CD56+。

[0595] B7. 实施方案B1至B6中任一项的组合物,其中被修饰的群体富含激活的细胞毒性细胞,其为CD57-。

[0596] B8. 实施方案B1至B7中任一项的组合物,其中所述群体富含激活的细胞毒性细胞,其为CD56+CD57-。

[0597] B9. 实施方案B6至B8中任一项的组合物,其中约80%至约100%,或至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、



96%、97%、98%、99%或100%的细胞是CD56+。

[0598] B10.实施方案B6至B9中任一项的组合物,其中约10%至约40%,或至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的细胞是CD16+。

[0599] B11.实施方案B6至B10中任一项的组合物,其中少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的细胞是CD57+。

[0600] B12.实施方案B1至B11中任一项的组合物,其基本上不含除NK细胞和 $\gamma$ . $\delta$ T细胞以外的细胞。

[0601] B13.实施方案B1至B12中任一项的组合物,其包含少于5%的NKT细胞。

[0602] B14.实施方案B1至B13中任一项的组合物,其包含少于1%的NKT细胞。

[0603] B15.实施方案B1至B14中任一项的组合物,其包含少于0.1%的NKT细胞。

[0604] B16.实施方案B1至B15中任一项的组合物,其包含少于2%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。

[0605] B17.实施方案B1至B16中任一项的组合物,其包含少于1%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。

[0606] B18.实施方案B1至B17中任一项的组合物,其包含少于0.1%的 $\alpha$ . $\beta$ T细胞。

[0607] B19.实施方案B1至B18中任一项的组合物,其中所述群体中的NK细胞的子集是CD16+细胞。

[0608] B20.实施方案B1至B19中任一项的组合物,其中大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD57-细胞。

[0609] B21.实施方案B1至B20中任一项的组合物,其中大多数的NK细胞是CD57-细胞。

[0610] B22.实施方案B1至B21中任一项的组合物,其中所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞相对于V. $\delta$ .1和V. $\delta$ .2表达是多克隆的。

[0611] B23.实施方案B22的组合物,其中所述多克隆 $\gamma$ . $\delta$ T细胞包含至少一个选自V. $\delta$ .1+和V. $\delta$ .1-的亚群和至少一个选自V. $\delta$ .2+和V. $\delta$ .2-的亚群。

[0612] B24.实施方案B1至B23中任一项的组合物,其中:

[0613] 大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .1,和少数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .2;或

[0614] 少数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .1,和大多数的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞表达V. $\delta$ .2表达。

[0615] B25.实施方案B1至B24中任一项的组合物,其中:

[0616] 所述群体中的少数细胞是CD3阳性细胞,并且所述群体中的大多数细胞是CD3阴性细胞;或

[0617] 所述群体中的大多数细胞是CD3阳性细胞,并且所述群体中的少数细胞是CD3阴性细胞。

[0618] B26.实施方案B1至B25中任一项的组合物,其中NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率大于1。

[0619] B27.实施方案B1至B25中任一项的组合物,其中NK细胞与 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的比率小于1。

[0620] B28.实施方案B26的组合物,其中所述被修饰的细胞群体包含约98-99%的NK细胞和约1-2%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0621] B29.实施方案B27的组合物,其中所述被修饰的细胞群体包含约25%至约45%的NK细胞和约55%至约75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0622] B30.实施方案B27的组合物,其中所述被修饰的细胞群体包含约25-30%的NK细胞和约70-75%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0623] B31. 实施方案B27的组合物,其中所述被修饰的细胞群体包含约40-45%的NK细胞和约55-60%的 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0624] B32. 实施方案B1至B31中任一项的组合物,其中约50%至约99%或更多,或大于或等于约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8+。

[0625] B33. 实施方案B32的组合物,其中少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD4+。

[0626] B34. 实施方案B32或B33的组合物,其中少于2%的所述NK细胞和/或所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞是CD8+CD4+。

[0627] B35. 实施方案B32至B34中任一项的组合物,其中约15%至约30%的所述NK细胞和/或约55%至85%的所述 $\gamma$ . $\delta$ T细胞中的部分是CD8-CD4-。

[0628] B36. 实施方案B1至B35中任一项的组合物,其中所述群体中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞进一步包含遗传修饰,所述遗传修饰包括外源多核苷酸、突变的多核苷酸、缺失的多核苷酸或其组合。

[0629] B36.1 实施方案B36的组合物,其包含多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。

[0630] B37. 实施方案B36或B36.1的组合物,其中所述群体中至少约95%、96%、97%、98%、99%的细胞包含所述遗传修饰,或所述群体中约100%或100%的细胞包含所述遗传修饰。

[0631] B38. 实施方案B36、B36.1或B37中任一项的组合物,其中所述遗传修饰包括外源多核苷酸。

[0632] B39. 实施方案B38的组合物,其中所述外源多核苷酸处于逆转录病毒载体或慢病毒载体中。

[0633] B40. 实施方案B38的组合物,其中所述外源多核苷酸整合到所述被修饰的细胞群体的一个或多个细胞的基因组中。

[0634] B41. 实施方案B36至B40中任一项的组合物,其中所述群体中的细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0635] B42. 实施方案B41的组合物,其中所述嵌合抗原受体包含与CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123或CD30中的一者或多者免疫特异性结合的结合分子部分。

[0636] B43. 实施方案B1至B42中任一项的组合物,其中包含所述多个NK细胞和所述多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞的所述群体来源于多于一个受试者的外周血细胞。

- [0637] C1. 一种药物组合物,其包含实施方案B1至B43中任一项的组合物和药学上可接受的载体。
- [0638] D1. 一种制备修饰的免疫细胞的方法,其包括以下一者或多者:
- [0639] (a) 将外源多核苷酸添加到实施方案A66和B1至B35中任一项的组合物中;
- [0640] (b) 使实施方案A66和B1至B35中任一项的组合物的一个或多个细胞中的多核苷酸突变;或
- [0641] (c) 使实施方案A66和B1至B35中任一项的组合物的一个或多个细胞中的多核苷酸缺失。
- [0642] D2. 实施方案D1的方法,其中所述遗传修饰是通过逆转录病毒转导、慢病毒转导、电穿孔、转染、CRISPR/cas9或TALENS。
- [0643] D3. 实施方案D1或D2的方法,其中所述遗传修饰由或基本上由如(a)中添加外源多核苷酸组成。
- [0644] D4. 实施方案D1-D3中任一项的方法,其中所述遗传修饰包括如(a)中添加外源多核苷酸和/或如(b)中使多核苷酸突变,并且将所述外源多核苷酸和/或所述突变多核苷酸整合入所述免疫细胞的基因组。
- [0645] D5. 实施方案D4的方法,其中所述整合是通过电穿孔、转染、CRISPR/cas9或TALENS。
- [0646] D6. 实施方案D1至D5中任一项的方法,其中所述外源多核苷酸编码嵌合抗原受体(CAR)。
- [0647] D7. 实施方案D6的方法,其中所述嵌合抗原受体包含与CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123或CD30中的一者或多者免疫特异性结合的结合分子部分。
- [0648] D8. 实施方案D1至D7中任一项的方法,其中所述群体中约30%至约99%或更多,或至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其部分,至多100%的细胞包含所述遗传修饰。
- [0649] D8.1 实施方案D8的方法,其中所述群体中的细胞包括多个NK细胞和多个 $\gamma$ . $\delta$ T细胞。
- [0650] D9. 实施方案D8或D8.1的方法,其中所述遗传修饰包括外源多核苷酸。
- [0651] D10. 实施方案D9的方法,其中所述群体中约100%或100%的细胞包含所述外源多核苷酸。
- [0652] E1. 一种试剂盒,其包括实施方案A66和B1至B43中任一项的组合物或实施方案C1的药物组合物,任选地还包括使用说明书和任选地细胞因子。
- [0653] E2. 实施方案E1的试剂盒,其中所述组合物或所述药物组合物处于负4摄氏度或更低温度。
- [0654] E3. 实施方案E2的试剂盒,其中所述组合物或所述药物组合物处于约负75摄氏度至约负80摄氏度。

- [0655] E4. 实施方案E1至E3中任一项的试剂盒,其包括约 $1 \times 10^5$ 细胞至约 $1 \times 10^{12}$ 细胞。
- [0656] E5. 实施方案E1至E4中任一项的试剂盒,其中所述细胞因子是白细胞介素多肽。
- [0657] E6. 实施方案E5的试剂盒,其中所述白细胞介素肽是IL-2、IL-4或IL-15。
- [0658] E7. 实施方案E1至E6中任一项的试剂盒,其不含非人血清和/或不含牛血清。
- [0659] E8. 实施方案E1至E7中任一项的试剂盒,其不含异种成分(xenogen)。
- [0660] E9. 实施方案E1至E8中任一项的试剂盒,其不含外源饲养细胞。
- [0661] E10. 实施方案E1至E9中任一项的试剂盒,其为单位剂型。
- [0662] E11. 实施方案E10的试剂盒,其中所述单位剂型是约 $1 \times 10^6$ 个细胞至约 $1 \times 10^{12}$ 个细胞。
- [0663] F1. 一种来自不同供体受试者的细胞的集合,其包括多个容器,每个容器包括来自一个或多个供体受试者的细胞,其中每个容器包括实施方案A66和B1至B43中任一项的组合物、实施方案C1的药物组合物或实施方案E1至E11中任一项的试剂盒。
- [0664] G1. 一种治疗癌症或感染的方法,其包括以有效治疗所述癌症或感染的量向有需要的受试者施用实施方案A66和B1至B43中任一项的组合物、实施方案C1的药物组合物或实施方案E1至E11中任一项的试剂盒,其中所述组合物、所述药物组合物或所述试剂盒中的细胞相对于所述受试者是同种异体的。
- [0665] G2. 一种治疗癌症或感染的方法,其包括以有效治疗所述癌症或感染的量向有需要的受试者施用实施方案A66和B1至B43中任一项的组合物、实施方案C1的药物组合物或实施方案E1至E11中任一项的试剂盒,其中所述组合物、所述药物组合物或所述试剂盒中的细胞相对于所述受试者是自体的。
- [0666] G3. 实施方案G1或实施方案G2的方法,其包括在两个或更多个分开的天向所述受试者施用所述组合物。
- [0667] G4. 实施方案G2或实施方案G3的方法,其中所述细胞的供体是所述治疗的接受者。
- [0668] G5. 实施方案G1或实施方案G3的方法,其中所述细胞的供体不是所述治疗的接受者。
- [0669] G6. 实施方案G5的方法,其中如果用来自供体的 $\alpha$ .BT细胞治疗,则所述治疗的接受者对GvHD敏感。
- [0670] G7. 实施方案G1至G6中任一项的方法,其中所述治疗以约1单位剂量至约36或更多单位剂量、以约2周至约4周的时间间隔施用。
- [0671] G8. 实施方案G1至G6中任一项的方法,其中所述治疗以单一单位剂量每天一次、两次、三次、四次或至多五次,或在数天、数周或数月的时间内一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或更多次,或隔日一次,或者一周一次、两次、三次、四次、五次或六次施用。
- [0672] G9. 实施方案G1至G8中任一项的方法,其中所述治疗通过静脉内(IV)、鞘内或肌内(IM)、腹膜内(IP)、胸膜内、关节腔内施用或在癌症或感染的部位处或附近注射或植入。
- [0673] G10. 实施方案G8或G9的方法,其中所述单位剂量包括每千克受试者体重约 $10^4$ 至约 $10^{10}$ 个细胞,或每受试者约 $10^6$ 至约 $10^{12}$ 个细胞。
- [0674] G11. 实施方案G10的方法,其中所述单位剂量是每受试者约 $10^{10}$ 个细胞,或每千克受试者体重约 $10^8$ 个细胞。

[0675] G12. 实施方案G1至G11中任一项的方法,其中所述治疗是针对癌症。

[0676] G13. 实施方案G12的方法,其中所述癌症选自肺癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病或淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或儿童急性淋巴母细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、肥大细胞瘤或肥大细胞肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肝癌、视网膜母细胞瘤、乳腺肿瘤、结肠直肠癌、白血病、淋巴瘤、急性淋巴母细胞白血病(ALL)或急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、组织细胞肉瘤、脑肿瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经瘤、结肠癌、宫颈癌、肉瘤、膀胱肿瘤、网状内皮组织肿瘤、威尔姆氏瘤、骨癌、骨肉瘤、肾癌或头颈癌、口腔癌、喉癌、转移性疾病或咽喉癌。

[0677] G14. 实施方案G12或G13的方法,其中将第二药剂与所述组合物、药物组合物或试剂盒共同施用。

[0678] G15. 实施方案G14的方法,其中所述第二药剂是与癌症相关抗原免疫特异性结合的抗体。

[0679] G16. 实施方案G15的方法,其中所述癌症相关抗原选自由以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM-5)、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- $\beta$ 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、PD1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、生存素、生存素-2B、TAC、TAG-72、肌腱蛋白、TRAIL受体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6和Kras。

[0680] G17. 实施方案G15或G16的方法,其中所述抗体选自hR1(抗IGF-1R)、hPAM4(抗粘蛋白)、KC4(抗粘蛋白)、hA20(抗CD20)、hA19(抗CD19)、hIMMU31(抗AFP)、hLL1(抗CD74)、hLL2(抗CD22)、抗CD19/CD22双特异性抗体、RFB4(抗CD22)、hMu-9(抗CSAp)、hL243(抗HLA-DR)、hMN-14(抗CEACAM-5)、hMN-15(抗CEACAM-6)、hRS7(抗TROP-2)、hMN-3(抗CEACAM-6)、CC49(抗TAG-72)、J591(抗PSMA)、D2/B(抗PSMA)、G250(抗碳酸酐酶IX)、迪妥昔单抗(dinutuximab)(抗GD2)、英夫利昔单抗(抗TNF- $\alpha$ )、赛妥珠单抗聚乙二醇(抗TNF- $\alpha$ )、阿达木

单抗(抗TNF- $\alpha$ )、阿仑单抗(抗CD52)、贝伐单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(抗CD20)、帕尼单抗(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、GA101(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗HER2/neu)、托珠单抗(抗IL-6受体)、巴利昔单抗(抗CD25)、达克珠单抗(抗CD25)、依法珠单抗(抗CD11a)、莫罗单抗-CD3(抗CD3受体)、那他珠单抗(抗 $\alpha$ 4整联蛋白)、BWA-3(抗组蛋白H2A/H4)、LG2-1(抗组蛋白H3)、MRA12(抗组蛋白H1)、PR1-1(抗组蛋白H2B)、LG11-2(抗组蛋白H2B)和LG2-2(抗组蛋白H2B)。

[0681] G18.实施方案G1至G11中任一项的方法,其中所述治疗是针对感染。

[0682] G19.实施方案G18的方法,其中所述感染是通过细菌、真菌、病毒或原生动植物病原体的存在来表征的。

[0683] G20.实施方案G19的方法,其中所述感染选自由以下组成的组:疱疹、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、牛痘病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒(例如HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、水泡性口腔炎病毒(VSV)、杆菌(Bacilli)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、霍乱(Cholera)、白喉(Diphtheria)、肠杆菌(Enterobacter)、淋球菌(Gonococci)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、克雷伯菌属(Klebsiella)、军团菌属(Legionella)、脑膜炎球菌(Meningococci)、分枝杆菌(mycobacteria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、肺炎球菌(Pneumonococci)、立克次氏菌(rickettsia bacteria)、沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)、葡萄球菌属(Staphylococci)、链球菌属(Streptococci)、破伤风(Tetanus)、曲霉属(Aspergillus)(烟曲霉(A.fumigatus)、黑曲霉(A.niger)等)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、念珠菌属(Candida)(白色念珠菌(C.albicans)、克鲁斯念珠菌(C.krusei)、光滑念珠菌(C.glabrata)、热带念珠菌(C.tropicalis)等)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、毛霉菌属(Genus Mucorales)(毛霉菌(mucor)、犁头霉(absidia)、根霉(rhizopus))、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenckii)、巴西芽生菌(Paracoccidioides brasiliensis)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、钩端螺旋体病(Leptospirosis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、蠕虫寄生虫(helminth parasite)(钩虫(hookworm)、绦虫(tapeworms)、吸虫(flukes)、扁虫(flatworms)(例如血吸虫病(Schistosomia)、蓝氏贾第虫(Giardia lamblia)、旋毛虫(trichinella)、脆弱双核阿米巴(Dientamoeba Fragilis)、布氏锥虫(Trypanosoma brucei)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)或杜氏利什曼虫(Leishmania donovani))。

[0684] \*\*\*

[0685] 本文中引用的每个专利、专利申请、公开和文献的全部内容通过引用并入本文中。引用以上专利、专利申请、出版物和文献并不意味着承认任何上述内容都是相关的现有技术,也不构成对这些公开或文献的内容或日期的任何承认。它们的引用并不表示检索相关公开。关于文献日期或内容的所有声明均基于可获得的信息,并非承认其准确性或正确性。

[0686] 可以在不脱离本技术的基本方面的情况下对前述内容进行修改。尽管已经参考一个或多个具体实施方案对本技术进行了大量详细描述,但是本领域普通技术人员将认识到可以对本申请中具体公开的实施方案进行改变,但是这些修改和改进在本技术的范围和精神内。

[0687] 本文中说明性描述的技术可以在缺少本文未具体公开的任何元素的情况下适当地实施。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包括/包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的任何一个都可以用另外两个术语中的任一个代替。已经采用的术语和表达用作描述而不是限制的术语,并且此类术语和表达的使用不排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同形式,并且在要求保护的技术的范围内可以进行各种修改。除非在上下文中明确地知道描述的是多个元素中的任一者或多个元素中的多于一者,否则术语“一(a)”或“一(an)”可以指代其修饰的元素的一个或多个(例如,“一试剂”可以表示一种或多种试剂)。如本文所用,术语“约”是指基础参数的10%以内的值(即,正负10%),并且术语“约”在一串值的开头使用会修饰每个值(即,“约1、2和3”是指约1、约2和约3)。例如,“约100克”的重量可以包括90克和110克之间的重量。此外,当在本文中描述值的列表时(例如,约50%、60%、70%、80%、85%或86%),该列表包括其所有中间值和分数值(例如,54%、85.4%)。因此,应理解尽管已经通过代表性实施方案和任选的特征具体公开了本技术,但是所属领域技术人员可以采取本文所公开的概念的修改和变化,并且此类修改和变化被视为处在本发明的范围内。

[0688] 在随后的权利要求中阐述了本技术的某些实施方式。

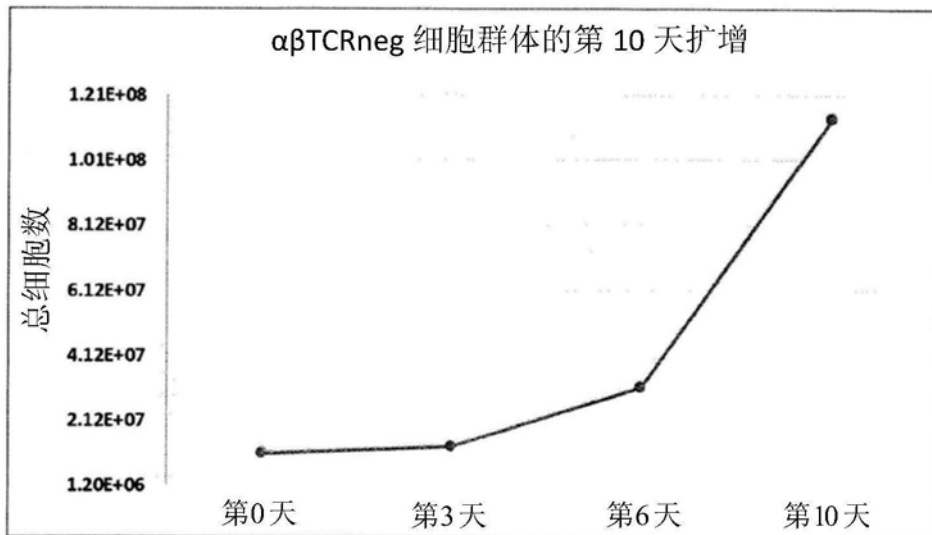


图1

先天性溶细胞性免疫细胞 (INNATE-K) 的富集

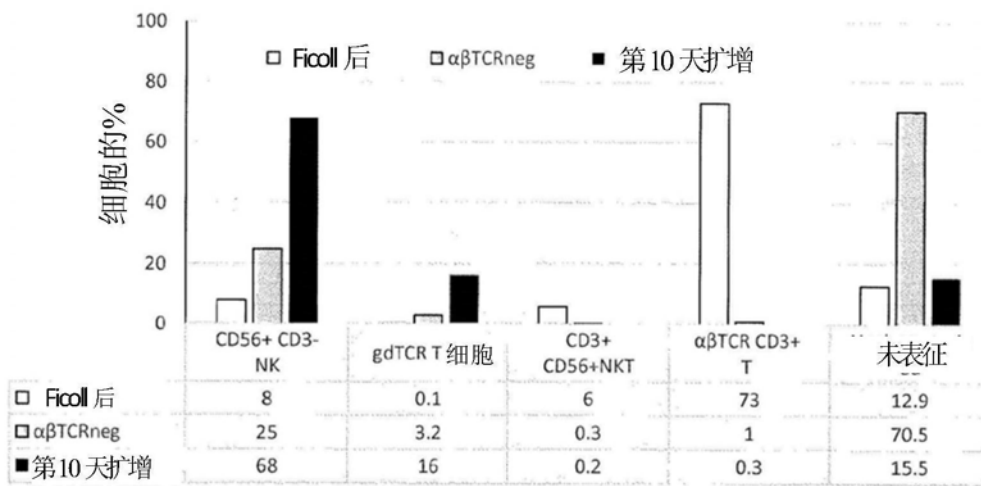


图2



第 10 天的  $\gamma\delta$ T 细胞谱系表型结果

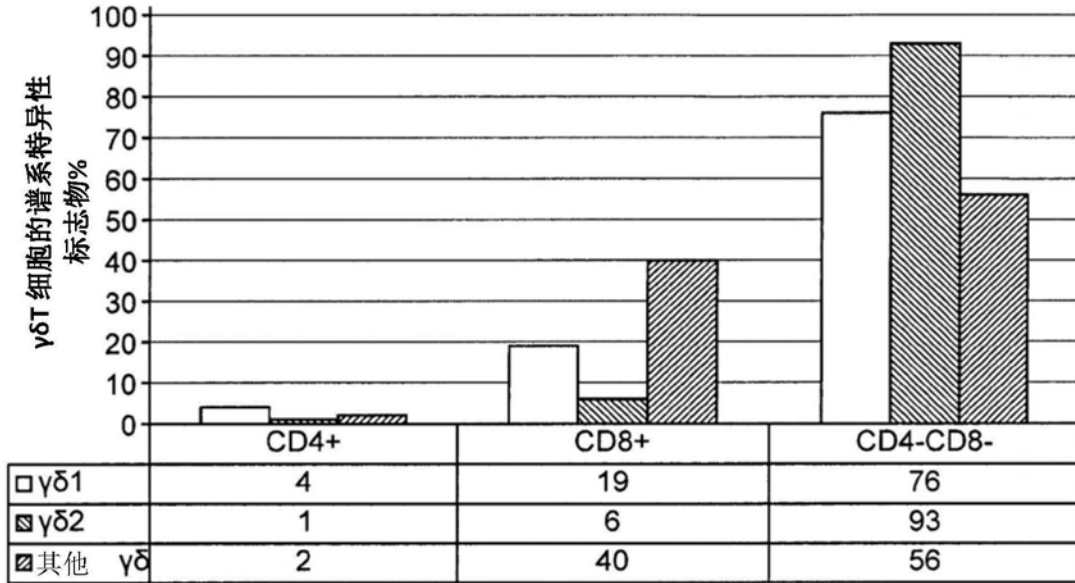


图3

CAR.19  $\alpha\beta$ TCRneg 细胞的第 10 天细胞扩增结果

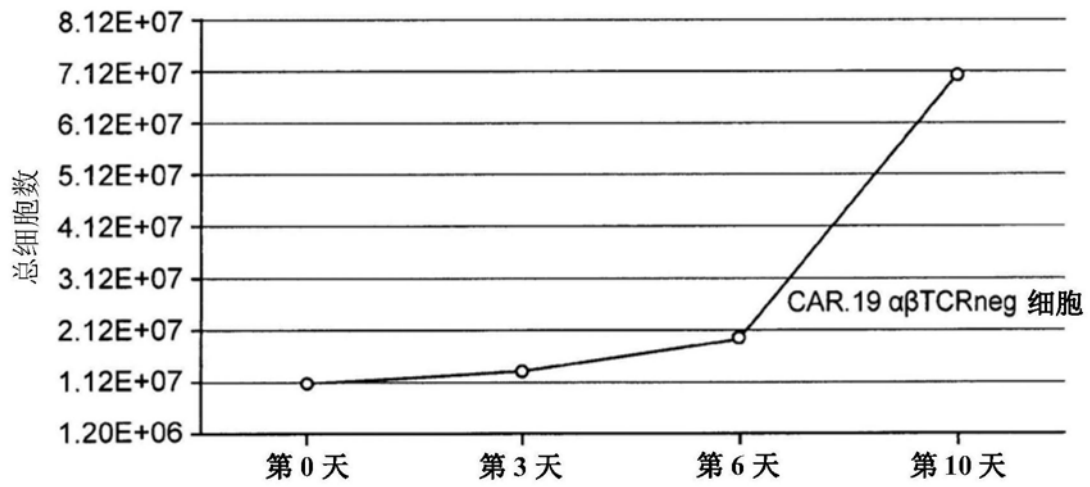


图4

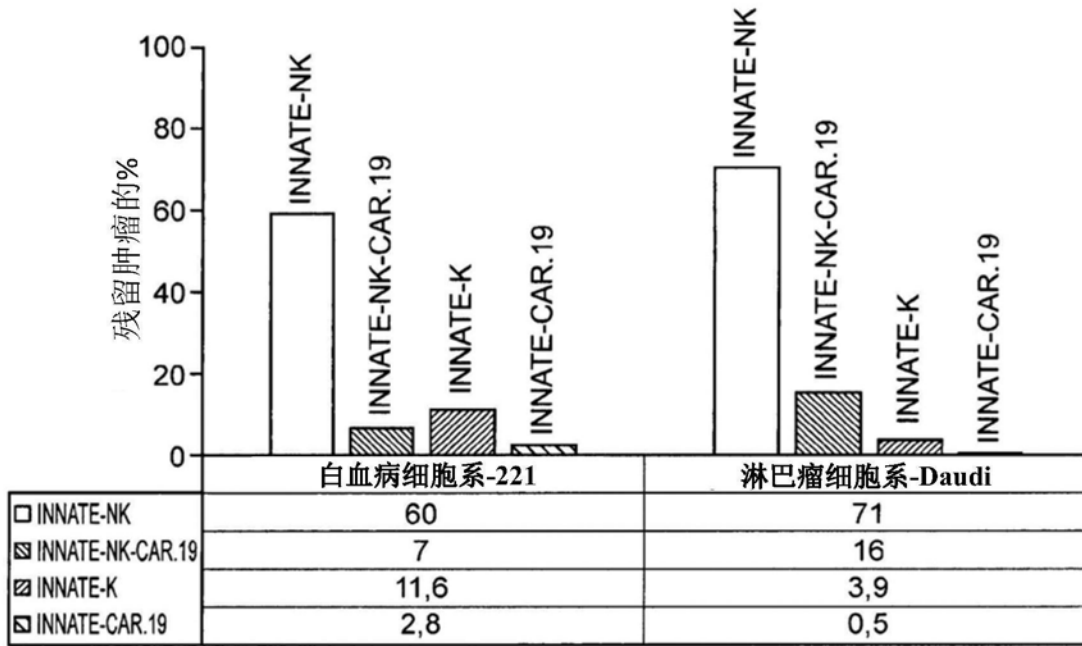


图5

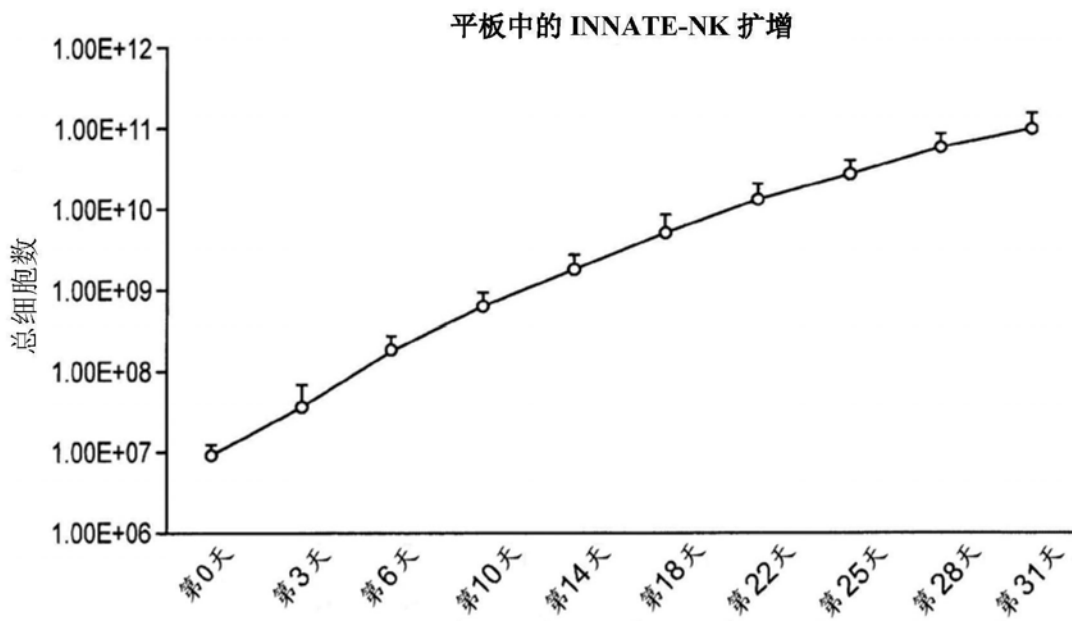


图6

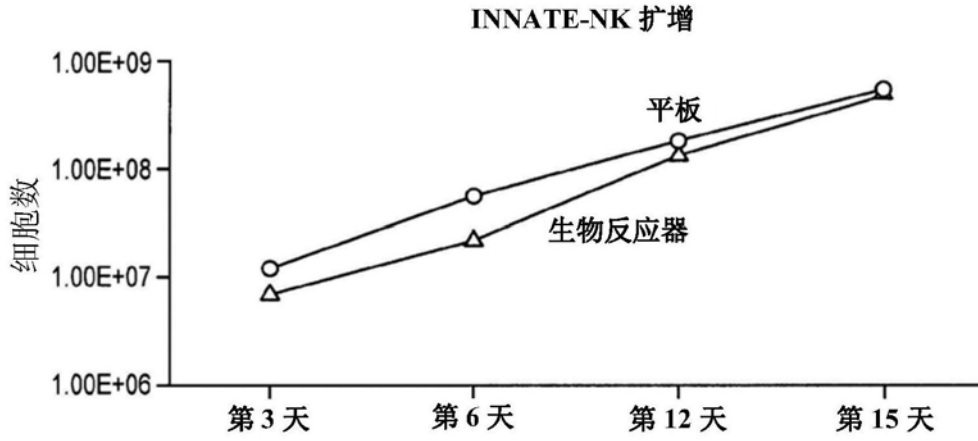


图7

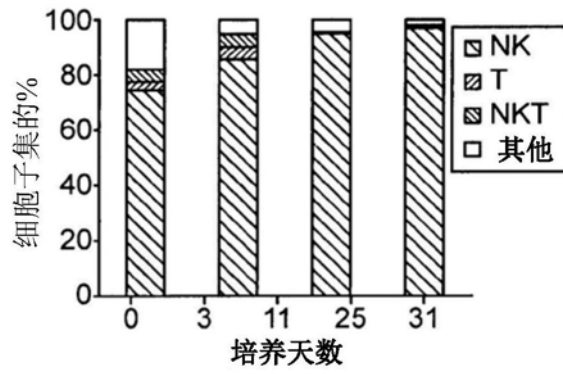


图8

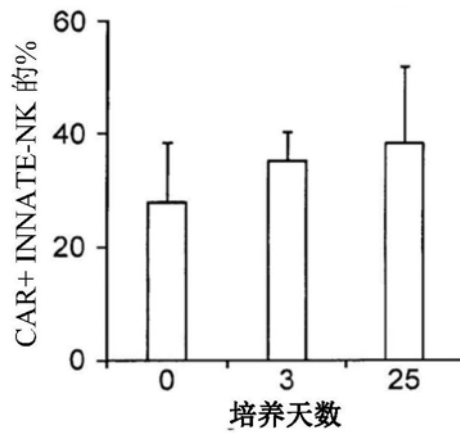


图9

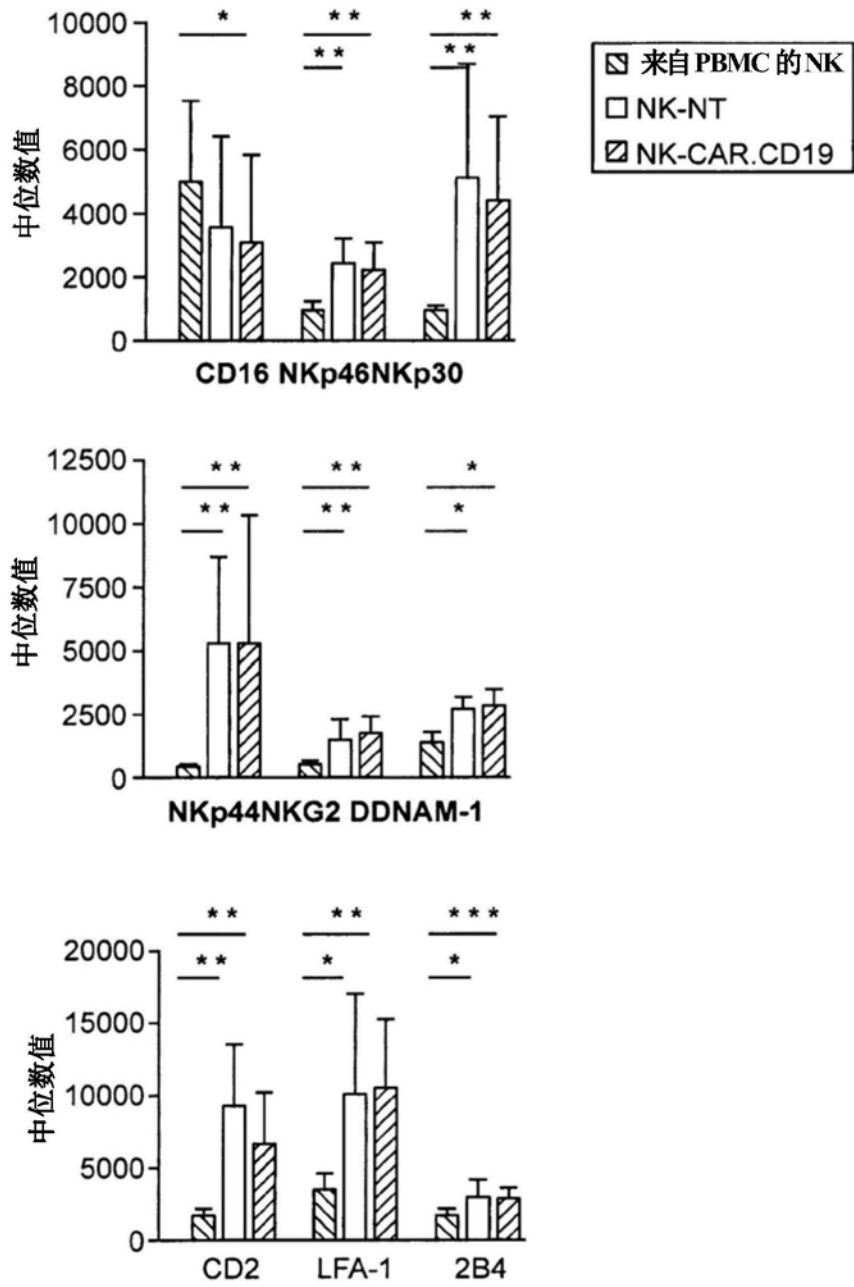


图10

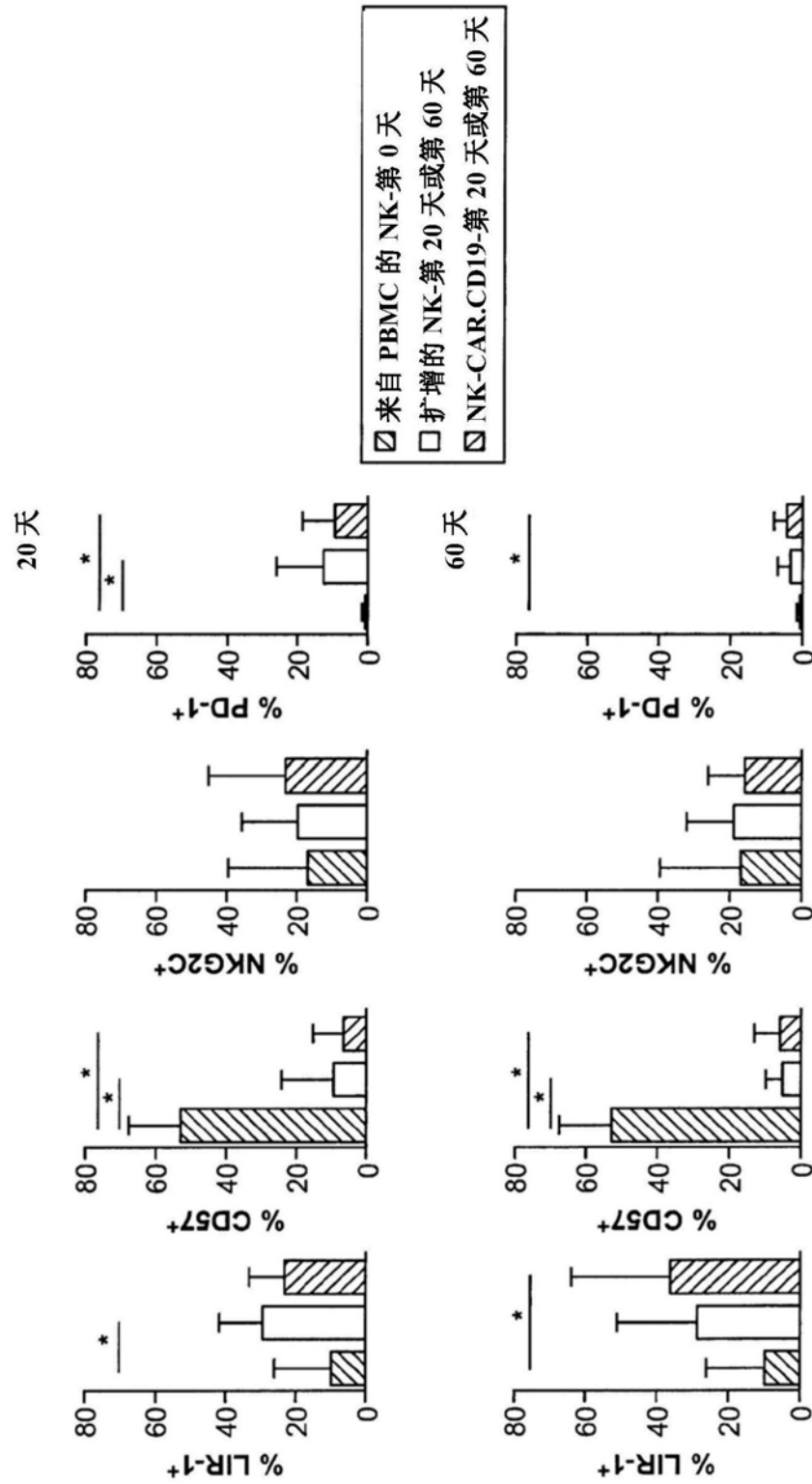


图11

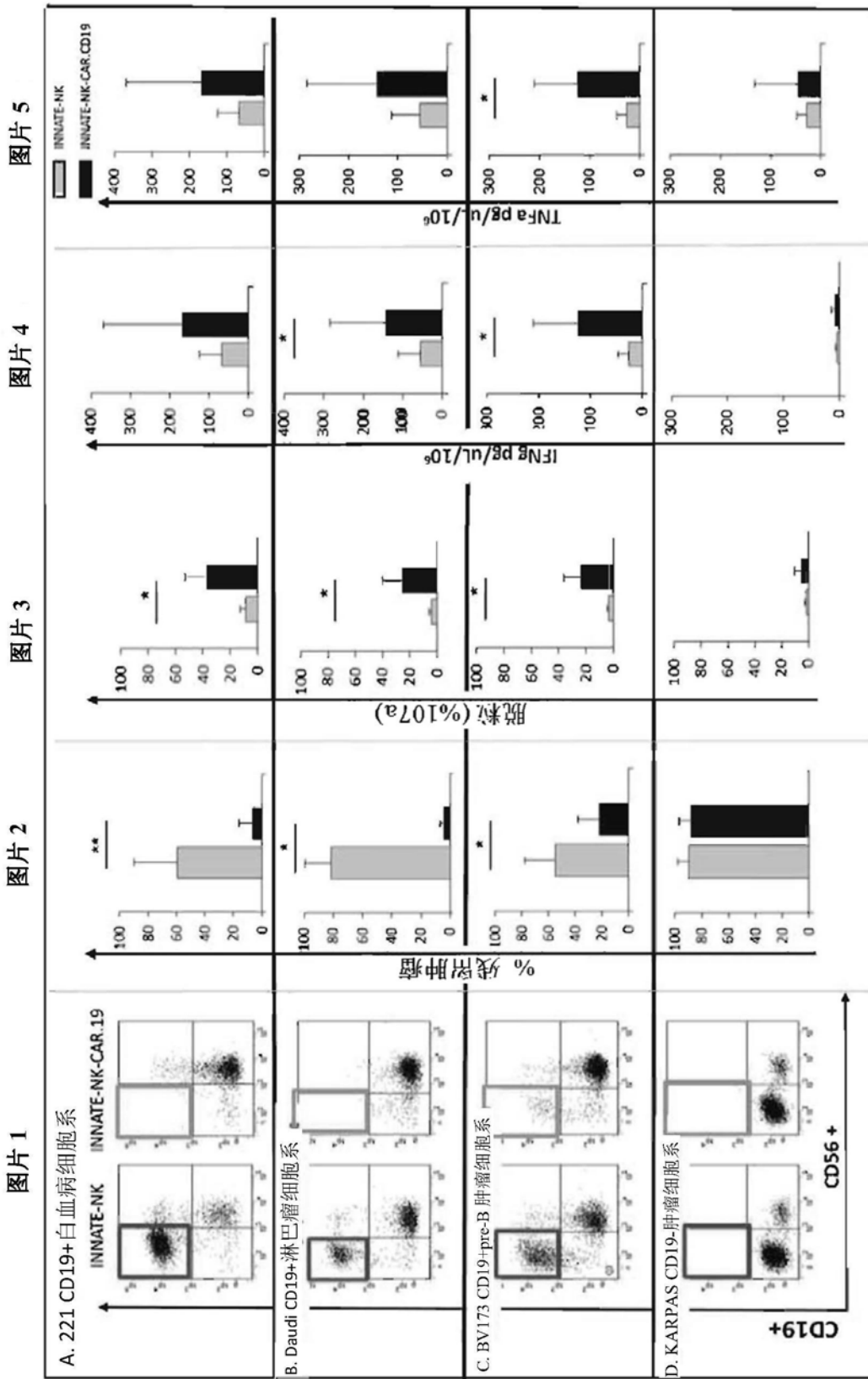


图12

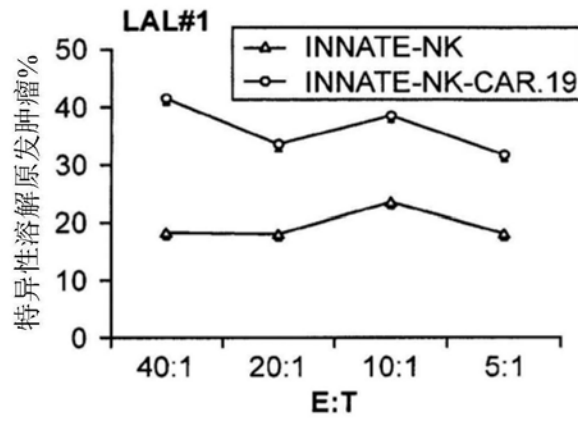


图13

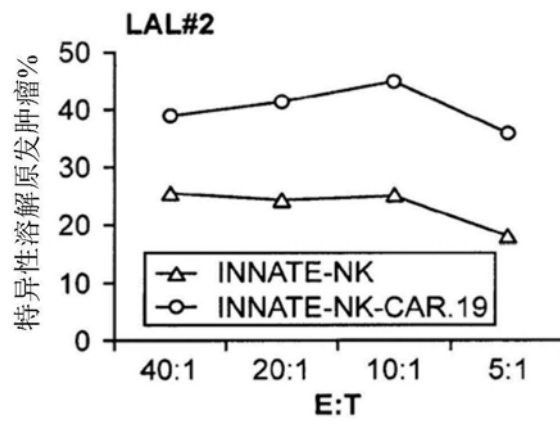


图14

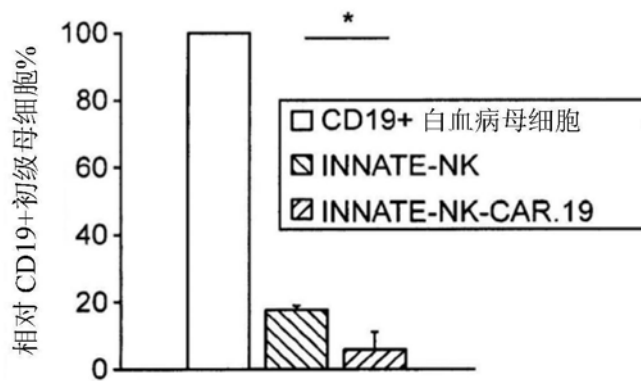


图15

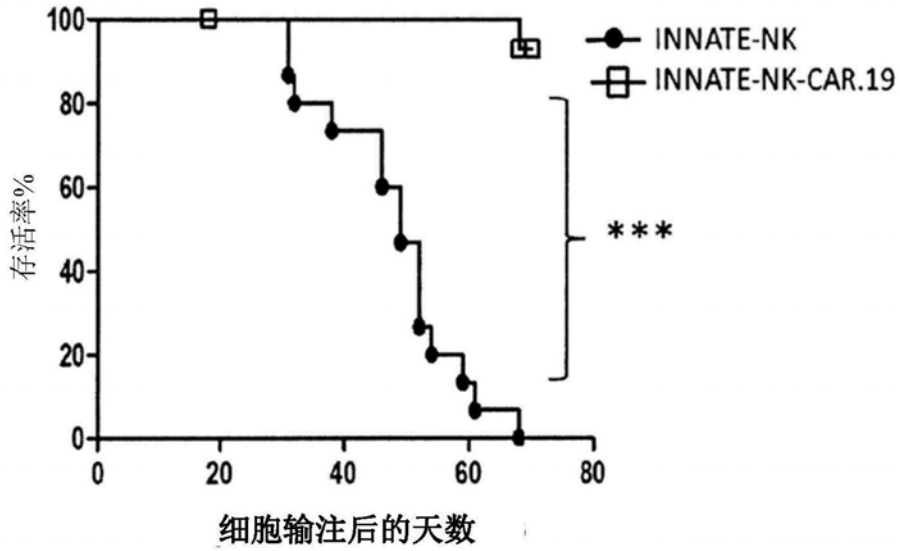


图16

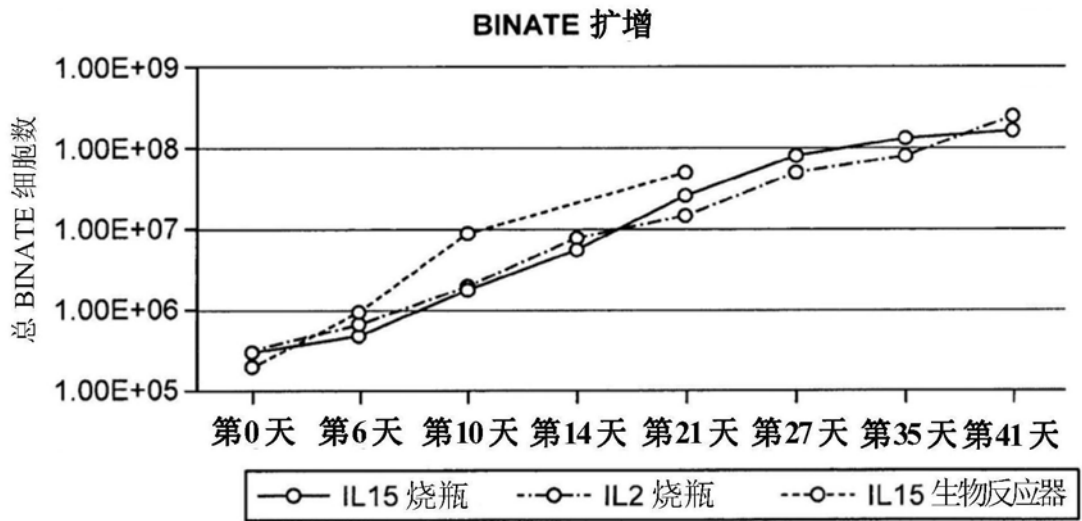


图17



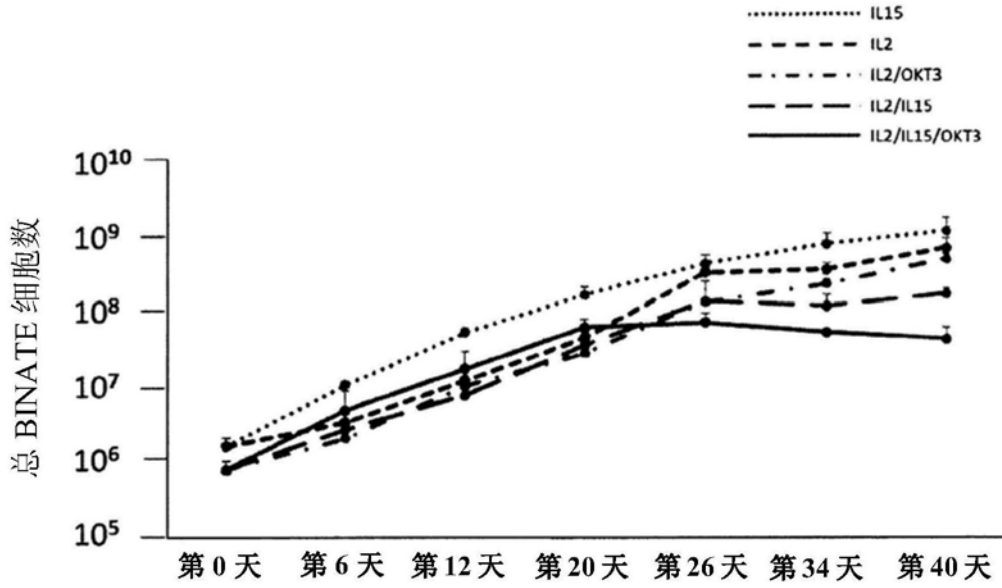


图18

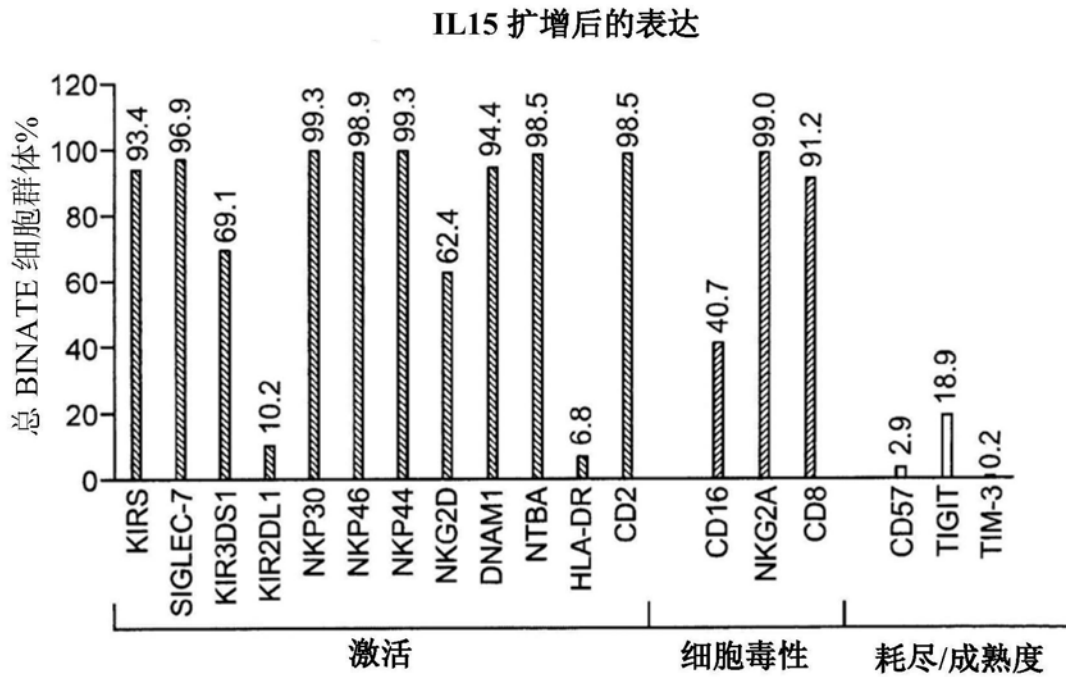


图19

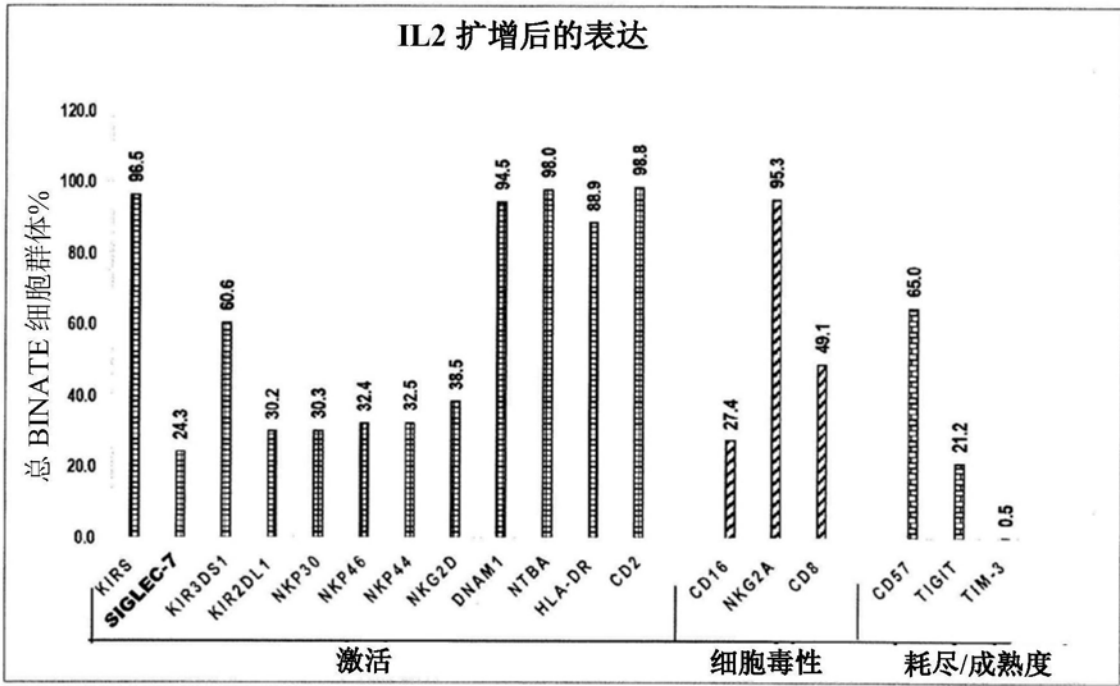


图20

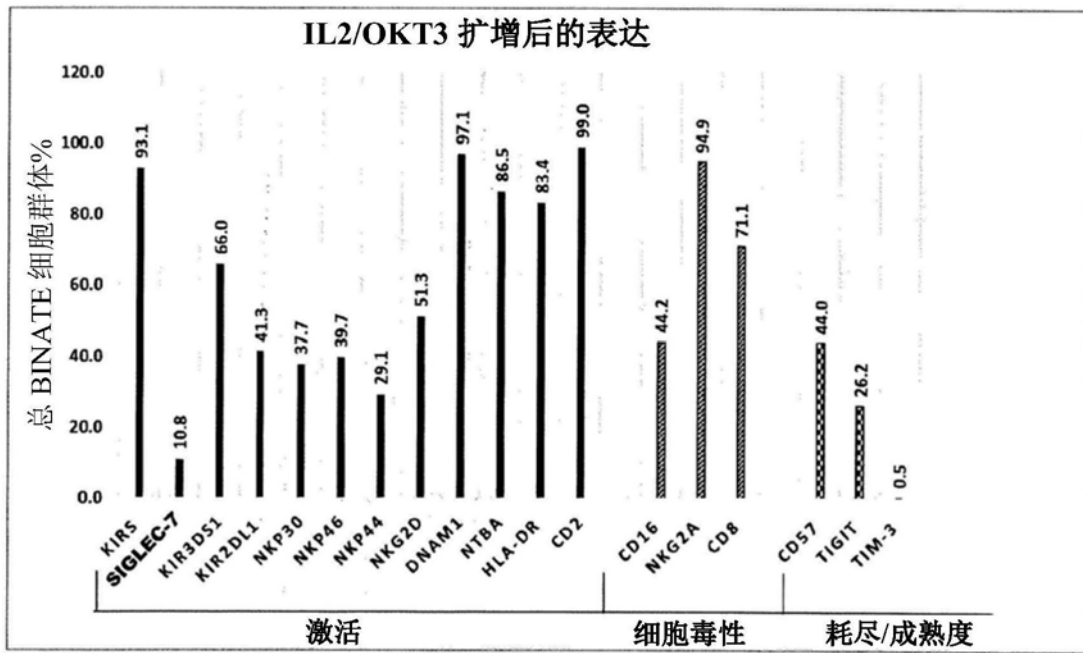


图21

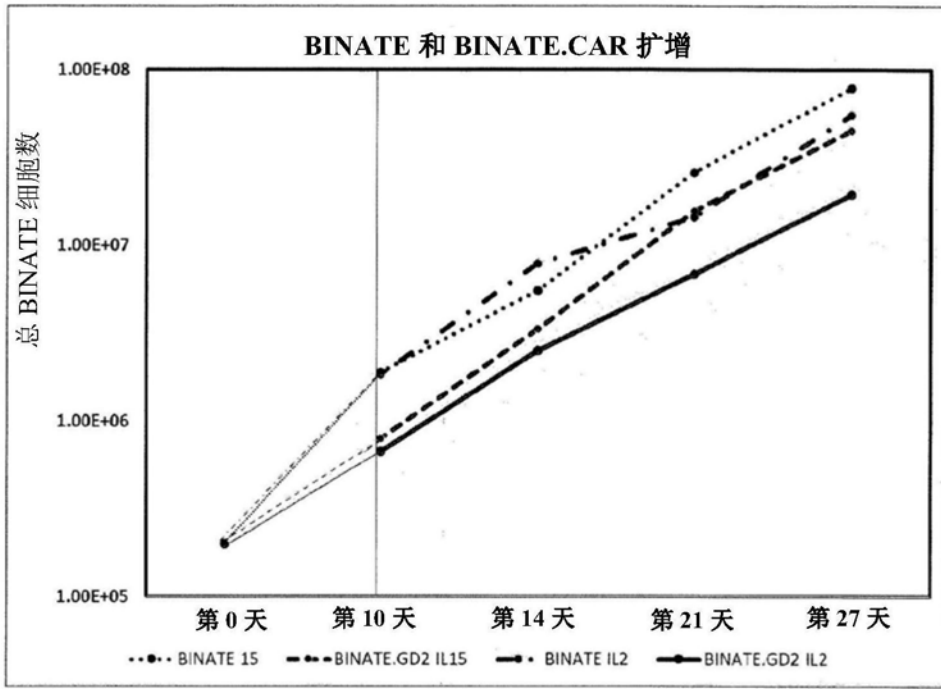


图22

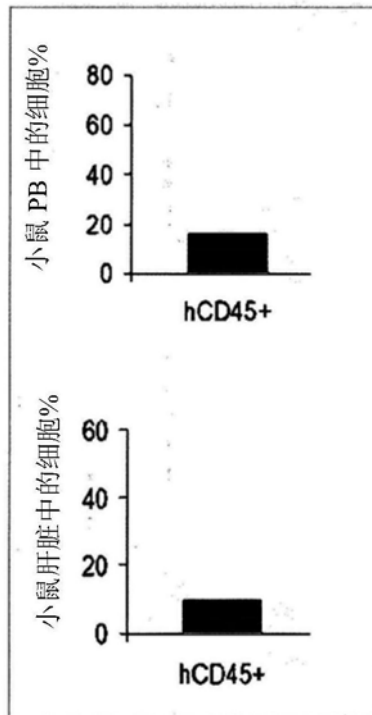


图23

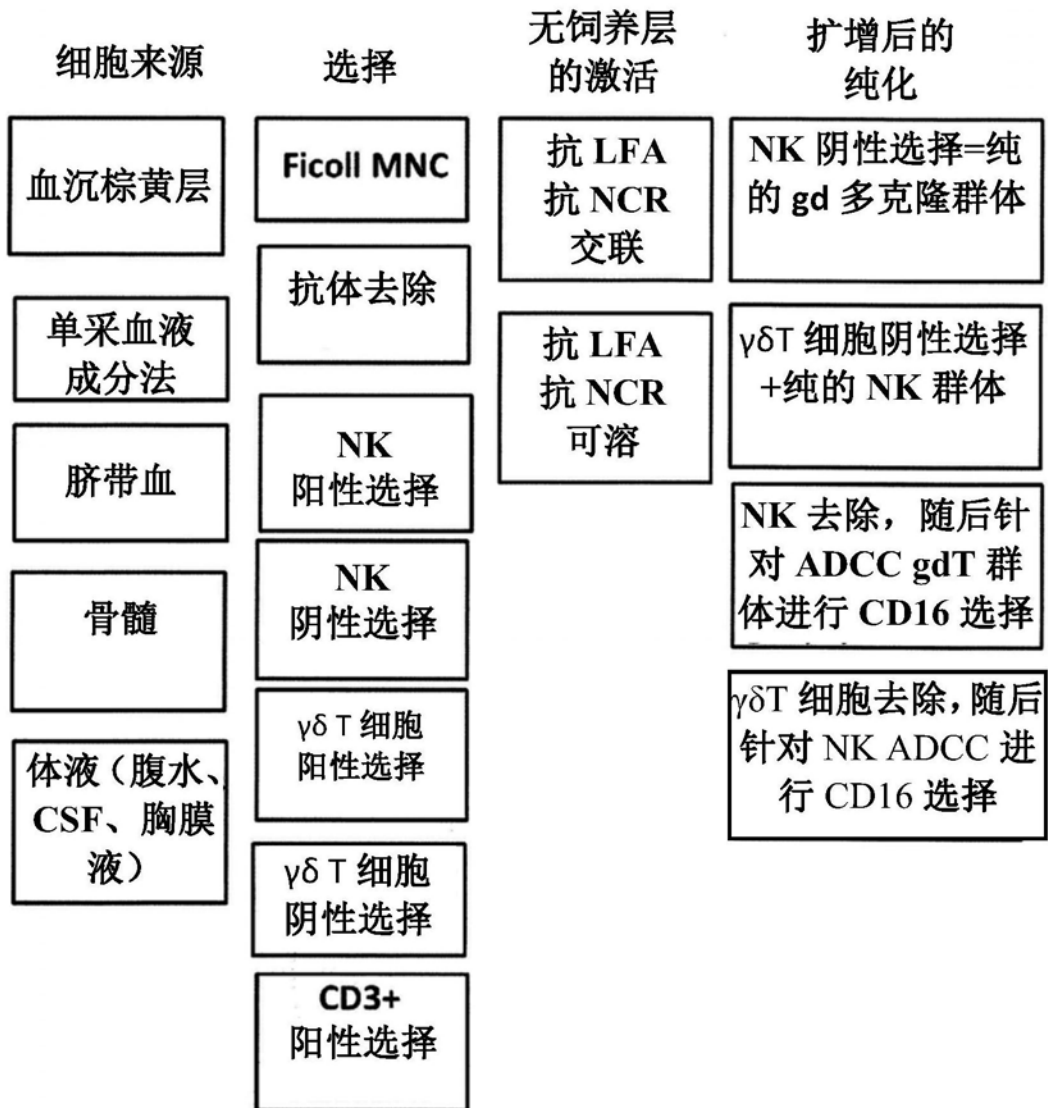


图24