

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-518009

(P2019-518009A)

(43) 公表日 令和1年6月27日 (2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-557334 (P2018-557334)	(71) 出願人	518071763
(86) (22) 出願日	平成29年5月3日 (2017.5.3)		スクイーズ バイオテクノロジーズ カン
(85) 翻訳文提出日	平成30年12月25日 (2018.12.25)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/030933		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02017/192786		4 7 2, ウォータータウン, クーリッ
(87) 国際公開日	平成29年11月9日 (2017.11.9)		ジ アベニュー 1 3 4
(31) 優先権主張番号	62/331, 384	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成28年5月3日 (2016.5.3)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 寛容性を誘導するための生体分子の細胞内送達

(57) 【要約】

本発明は、免疫細胞を含有する細胞懸濁液を狭窄部に通すことによって、抗原への寛容性を誘導するかまたは抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、抗原および／または寛容原性因子が細胞に入り、それによって寛容原性および／または免疫抑制免疫細胞が生成されるように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性および／または免疫抑制免疫細胞は、個体に送達され、前記抗原の提示は、該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が寛容原性免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップと
- を含む方法。

【請求項 2】

10

個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップと
- を含む方法。

【請求項 3】

20

個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が寛容原性免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップと
- を含む方法。

【請求項 4】

個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップと
- を含む方法。

【請求項 5】

30

個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、該抗原を含む寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

40

【請求項 6】

個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、該抗原および寛容原性因子を含む寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【請求項 7】

50

個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、該抗原を含む免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【請求項 8】

個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、該抗原および寛容原性因子を含む免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

10

【請求項 9】

寛容原性免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップを含み、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【請求項 10】

免疫抑制免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法。

20

【請求項 11】

前記細胞と接触した寛容原性因子および抗原が前記免疫細胞に入るように、前記狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫細胞が第 2 の狭窄部にさらに通され、前記細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該第 2 の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、請求項 9 または 10 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記免疫細胞が抗原提示細胞である、請求項 9 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

抗原を含む寛容原性抗原提示細胞を生成する方法であって、寛容原性抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該細胞と接触した抗原が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【請求項 15】

抗原を含む免疫抑制抗原提示細胞を生成する方法であって、免疫抑制抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該細胞と接触した抗原が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、方法。

40

【請求項 16】

寛容原性表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該寛容原性因子と接触させるステップであって、該寛容原性因子が免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、ステップとを含む方法。

【請求項 17】

50

寛容原性免疫細胞に抗原を送達するための方法であって、該寛容原性免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該寛容原性免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該抗原と接触させるステップとを含む方法。

【請求項 18】

免疫抑制表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該寛容原性因子と接触させるステップであって、該寛容原性因子が免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、ステップとを含む方法。

10

【請求項 19】

免疫抑制免疫細胞に抗原を送達するための方法であって、該免疫抑制免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫抑制免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該抗原と接触させるステップとを含む方法。

【請求項 20】

個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、

- a. 第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - c. 該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップと
- を含む方法。

20

【請求項 21】

前記第1または第2の免疫細胞による前記抗原の提示が、該抗原への免疫応答を抑制する、請求項20に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記第2の免疫細胞が前記第1の免疫細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制性の第1の免疫細胞を生成し、該免疫抑制性の第1の免疫細胞による前記抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、請求項20に記載の方法。

【請求項 23】

個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、

- a. 第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
- b. 第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
- c. 該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法。

40

【請求項 24】

前記第1または第2の免疫細胞による前記抗原の提示が、該抗原への寛容性を誘導する、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記第2の免疫細胞が前記第1の免疫細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛

50

容原性の第1の免疫細胞を生成し、該寛容原性の第1の免疫細胞による前記抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞が、前記個体に同時に導入される、請求項20～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞が、前記個体に逐次的に導入される、請求項20～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記寛容原性免疫細胞またはその前駆体が、アジュバントと接触していない、請求項1、2、5、6、9、11～14、16、17および23～27のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項29】

前記免疫抑制免疫細胞またはその前駆体が、アジュバントと接触していない、請求項3、4、7、8、10～13、15、18～22、26および27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記アジュバントが、TLR3およびRLRリガンド、TLR4リガンド、TLR5リガンド、TLR7／8リガンド、TLR9リガンド、NOD2リガンド、ミョウバン、油中水型エマルジョン、rhIL-2、抗CD40、CD40L、IL-12ならびに環状ジヌクレオチドからなる群から選択される、請求項28または29に記載の方法。

20

【請求項31】

前記寛容原性免疫細胞が、該寛容原性免疫細胞の非寛容原性前駆体と比較して1つまたは複数の共刺激シグナルを提供する低減された能力を含む、請求項1、2、5、6、9、11～14、16、17および23～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記免疫抑制免疫細胞が、該免疫抑制免疫細胞の非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の共刺激シグナルを提供する低減された能力を含む、請求項3、4、7、8、10～13、15、18～22、26、27および29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記1つまたは複数の共刺激シグナルが、CD40、CD80、CD86、CD54、CD83、CD79およびICOSリガンドからなる群から選択される分子によって媒介される、請求項31または32に記載の方法。

30

【請求項34】

前記寛容原性免疫細胞が、該寛容原性免疫細胞の非寛容原性前駆体と比較して1つまたは複数の炎症性シグナルを提供する低減された能力を含む、請求項1、2、5、6、9、11～14、16、17、23～28および31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

前記免疫抑制免疫細胞が、該免疫抑制免疫細胞の非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の炎症性シグナルを提供する低減された能力を含む、請求項3、4、7、8、10～13、15、18～22、26、27、29および32のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項36】

前記1つまたは複数の炎症性シグナルが、インターロイキン-1（IL-1）、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、NF-κB、インターフェロン調節因子（IRF）、およびJAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子からなる群から選択される分子によって媒介される、請求項34または35に記載の方法。

【請求項37】

前記寛容原性因子が、免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害

50

し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、請求項 2、4、6、8～11、16、18、20 および 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記抗原が、該寛容原性免疫細胞によって提示される、請求項 1、2、5、6、11～14、17、23～28 および 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記抗原が、前記免疫抑制免疫細胞によって提示される、請求項 3、4、7、8、11～13、15、19～22、26、27、29 および 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

少なくとも 1 つの他の抗原への寛容性が誘導される、請求項 2、6、9、11～13、16、23～28 および 31 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 41】

少なくとも 1 つの他の抗原への免疫応答が抑制される、請求項 4、8、10～13、18、20～22、26、27、29 および 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

少なくとも 1 つのさらなる抗原が、前記細胞に導入される、請求項 1～8、11、12、14、15、17、19 および 20～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

少なくとも 1 つのさらなる寛容原性因子が、前記細胞に導入される、請求項 2、4、6、8、9～11、16、18、20 および 23 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 44】

個体において免疫応答を抑制するための方法であって、
a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
b. 該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が発現され、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が遊離炎症性サイトカインを結合する、ステップとを含む方法。 30

【請求項 45】

前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、非機能的サイトカイン受容体を含む、請求項 44 に記載の方法。 30

【請求項 46】

前記非機能的サイトカイン受容体が、細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、標的サイトカインを切断するタンパク分解部位を含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 48】

前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、抗サイトカイン抗体を含む、請求項 44 に記載の方法。 40

【請求項 49】

前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、抗サイトカイン B 細胞受容体を含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 50】

前記免疫細胞が、前記個体に由来する、請求項 1～7 および 20～44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記免疫細胞が、異なる個体に由来する、請求項 1～7 および 20～44 のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 5 2】

前記狭窄部が、マイクロ流体チャネルの中に含有される、請求項 1～5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記狭窄部が孔であるか、または孔の中に含有される、請求項 1～5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記孔が、表面に含有される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記表面が、フィルターである、請求項 5 4 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

前記表面が、膜である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記狭窄部サイズが、前記免疫細胞の直径の関数である、請求項 1～5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記狭窄部サイズが、前記細胞直径の約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% または約 99% である、請求項 1～5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記チャネルが、約 10 μm の狭窄部長および約 4 μm の狭窄部幅を含む、請求項 1～5 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6 0】

前記孔径が、約 0.4 μm 、約 3 μm 、約 4 μm 、約 5 μm 、約 8 μm 、約 10 μm 、約 12 μm または約 14 μm である、請求項 1～5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

約 -5℃～約 45℃ の間で実行される、請求項 1～6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記細胞懸濁液が、混合細胞集団を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

前記細胞懸濁液が、全血である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記細胞懸濁液が、末梢血単核細胞を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記細胞懸濁液が、精製された細胞集団を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記細胞懸濁液が、哺乳動物細胞を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 7】

前記細胞懸濁液が、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記細胞懸濁液が、ヒト細胞を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記細胞懸濁液が、非哺乳動物細胞を含む、請求項 1～4、9、10 および 16～6 5 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 70】

前記細胞懸濁液が、細菌細胞、酵母細胞、ニワトリ細胞、カエル細胞、昆虫細胞、魚類細胞または線虫細胞を含む、請求項 1～4、9、10、16～65 および 69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記免疫細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1～13 および 16～68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記免疫細胞が、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞である、請求項 1～13、16～68 および 71 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 73】

前記免疫細胞が、ヒト細胞である、請求項 1～13、16～68 および 71 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髓由来サプレッサー細胞または肥満細胞である、請求項 1～13 および 16～73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

前記抗原提示細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 14、15 および 50～74 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 76】

前記抗原提示細胞が、サル、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタまたはウサギの細胞である、請求項 14、15 および 50～75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記抗原提示細胞が、ヒト細胞である、請求項 14、15 および 50～75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

前記抗原提示細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髓由来サプレッサー細胞または肥満細胞である、請求項 14、15 および 50～77 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 79】

前記抗原が、外来抗原である、請求項 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

前記抗原が、自己抗原である、請求項 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

前記抗原が、同種移植抗原である、請求項 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 82】

前記抗原が、タンパク質またはポリペプチドである、請求項 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

前記抗原が、溶解物である、請求項 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 84】

前記抗原が、修飾抗原である、請求項 1～15、20～43 および 50～83 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 85】

前記修飾抗原が、治療剤と融合した抗原を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記修飾抗原が、ターゲティングペプチドと融合した抗原を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 87】

前記細胞懸濁液が、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後に前記抗原と接触する、請求項 1～4、9、10 および 16～86 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

前記寛容原性因子が、共刺激分子の活性を阻害する、請求項 1～43 および 50～87 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 89】

前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を低下させる、請求項 1～43 および 50～88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現をモジュレートする核酸を欠失させる、請求項 1～43 および 50～89 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

前記寛容原性因子が、共刺激分子を阻害する、請求項 1～43 および 50～88 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 92】

前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる、請求項 1～43 および 50～91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる、請求項 1～43 および 50～91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

前記寛容原性因子が、前記共刺激分子のサプレッサーをコードする核酸を含む、請求項 1～43 および 50～88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

前記共刺激分子が、CD80 または CD86 である、請求項 88～94 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 96】

前記寛容原性因子が、免疫抑制因子の活性を増強する、請求項 1～43 および 50～95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

前記免疫抑制因子が、共阻害分子、転写レギュレーターまたは免疫抑制分子である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記寛容原性因子が、共阻害分子の活性を増強する、請求項 1～43、50～87、96 および 97 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 99】

前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 96～98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

前記寛容原性因子が、共阻害分子をコードする、請求項 1～43、50～87 および 96～99 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

前記寛容原性因子が、共阻害分子の活性を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 96～100 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 102】

前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 96～98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増加させるポリペプチドの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87、96～98 および 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記寛容原性因子が、共阻害分子のエンハンサーをコードする核酸を含む、請求項 1～43、50～87、96～98 および 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

前記共阻害分子が、PD-L1、PD-L2 または CTLA-4 である、請求項 97～104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記寛容原性因子が、前記免疫抑制分子の活性を増強する、請求項 1～43、50～87、96 および 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増加させる、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子をコードする、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 109】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の活性を増加させる、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 110】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増強するポリペプチドの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

前記寛容原性因子が、免疫抑制分子のエンハンサーをコードする核酸を含む、請求項 1～43、50～87、96、97 および 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 113】

前記免疫抑制分子が、ARG1、NO、NOS2、IDO、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN α または TGF β である、請求項 97 または 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記寛容原性因子が、炎症性分子の活性を阻害する、請求項 1～43 および 50～87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 115】

前記炎症性分子が、炎症性転写因子である、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記寛容原性因子が、炎症性転写因子を阻害する、請求項 1～43、50～87、114 および 115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 117】

前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を低下させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 118】

10

20

30

40

50

前記寛容原性因子が、炎症性転写因子をコードする核酸を欠失させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

のいずれか一項 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 120】

前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 121】

前記寛容原性因子が、炎症性転写因子のサプレッサーをコードする核酸を含む、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記炎症性転写因子が、NF- κ B、インターフェロン調節因子、または JAK-STAT シグナル伝達経路に関連した分子である、請求項 115～121 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

前記寛容原性因子が、1つまたは複数の炎症性サイトカインの産生および／または分泌を減少させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 124】

前記 1つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12 および IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN- γ)、ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) からなる群から選択される、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】

前記寛容原性因子が、1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの産生および／または分泌を増加させる、請求項 1～43、50～87 および 114～116 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 126】

前記 1つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN- α および トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF β) からなる群から選択される、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 127】

前記寛容原性因子が、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有する改変された TCR をコードする、請求項 1～43 および 50～87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 128】

前記寛容原性因子が、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有するキメラ抗原受容体をコードする、請求項 1～43 および 50～87 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 129】

前記寛容原性因子が、核酸を含む、請求項 1～43 および 50～128 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 130】

前記寛容原性因子が、siRNA、mRNA、miRNA、lncRNA、tRNA または shRNA をコードする核酸を含む、請求項 1～43 および 50～129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 131】

50

前記寛容原性因子が、プラスミドである、請求項 1～43 および 50～130 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 132】

前記寛容原性因子が、タンパク質核酸複合体を含む、請求項 1～43 および 50～128 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 133】

前記寛容原性因子が、Cas9 ポリペプチドおよびガイド RNA またはドナー DNA を含む、請求項 1～43、50～128 および 132 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 134】

前記寛容原性因子が、Cas9 ポリペプチドおよびガイド RNA またはドナー DNA をコードする核酸を含む、請求項 1～43 および 50～129 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 135】

前記寛容原性因子が、ポリペプチドを含む、請求項 1～43 および 50～128 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 136】

前記ポリペプチドが、ヌクレアーゼ、TALEN タンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼまたは CRE リコンビナーゼである、請求項 1～43、50～128 および 135 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 137】

前記ポリペプチドが、トランスポザーゼまたはインテグラーゼ酵素である、請求項 1～43、50～128 および 135 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 138】

前記ポリペプチドが、抗体である、請求項 1～43、50～128 および 135 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 139】

前記ポリペプチドが、転写因子である、請求項 1～43、50～128 および 135 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 140】

前記寛容原性因子が、小分子である、請求項 1～43 および 50～128 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 141】

前記寛容原性因子が、ナノ粒子である、請求項 1～43 および 50～128 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 142】

前記細胞懸濁液が、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後に前記寛容原性因子と接触する、請求項 1～43 および 50～141 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 143】

前記免疫応答が、少なくとも約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 75%、約 80%、約 90% または約 100% 抑制される、請求項 3、4、7、8 および 10～142 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 144】

前記抑制された免疫応答が、1つまたは複数の炎症性サイトカインの減少した産生および／または分泌を含む、請求項 3、4、7、8 および 10～143 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 145】

前記 1つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12 および IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN-γ) ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) からなる群から選択される、請求項 144 に記載の方法。

50

【請求項 1 4 6】

前記抑制された免疫応答が、1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの増加した産生および／または分泌を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記 1つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3、I L - 3 5、I F N - α およびトランスフォーミング成長因子ベータ (T G F β) からなる群から選択される、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記抑制された免疫応答が、T 細胞応答の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 1 4 9】

前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞活性化の減少を含む、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞生存の減少を含む、請求項 1 4 8 ～ 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞増殖の減少を含む、請求項 1 4 8 ～ 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞機能性の減少を含む、請求項 1 4 8 ～ 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 1 5 3】

前記抑制された免疫応答が、T r e g 応答の増強を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記抑制された免疫応答が、B 細胞応答の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記 B 細胞応答の減少が、抗体産生の減少を含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。 30

【請求項 1 5 6】

前記抑制された免疫応答が、サイトカイン産生の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記抑制された免疫応答が、自己免疫応答の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記抑制された免疫応答が、アレルギー応答の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記抗原が、移植組織に関連した抗原である、請求項 1 ～ 1 5、2 0 ～ 4 3 および 5 0 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 1 6 0】

前記抑制された免疫応答が、前記移植組織に対する免疫応答の減少を含む、請求項 3、4、7、8 および 1 0 ～ 1 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記抗原が、ウイルスに関連する、請求項 1 ～ 1 5、2 0 ～ 4 3 および 5 0 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記抑制された免疫応答が、前記ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む、請求項 3 50

、4、7、8および10～161のいずれか一項に記載の方法。

【請求項163】

前記抑制された免疫応答が、治療剤に対する免疫応答の減少を含む、請求項3、4、7、8および10～162のいずれか一項に記載の方法。

【請求項164】

前記抑制された免疫応答が、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む、請求項3、4、7、8および10～163のいずれか一項に記載の方法。

【請求項165】

前記寛容性が、1つまたは複数の炎症性サイトカインの産生および／または分泌の減少を含む、請求項1、2、5、6、23～43および50～142のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項166】

前記1つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1（IL-1）、IL-12およびIL-18、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN-γ）ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）からなる群から選択される、請求項165に記載の方法。

【請求項167】

前記寛容性が、1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの産生および／または分泌の増加を含む、請求項1、2、5、6、23～43および50～142のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項168】

前記1つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN-αおよびトランスフォーミング成長因子ベータ（TGFβ）からなる群から選択される、請求項167に記載の方法。

【請求項169】

前記寛容性が、T細胞応答の減少を含む、請求項1、2、5、6、23～43および50～142のいずれか一項に記載の方法。

【請求項170】

前記T細胞応答の減少が、T細胞活性化の減少を含む、請求項169に記載の方法。

【請求項171】

前記T細胞応答の減少が、T細胞生存の減少を含む、請求項169～170のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項172】

前記T細胞応答の減少が、T細胞増殖の減少を含む、請求項169～171のいずれか一項に記載の方法。

【請求項173】

前記T細胞応答の減少が、T細胞機能性の減少を含む、請求項169～172のいずれか一項に記載の方法。

【請求項174】

前記T細胞応答の減少が、T細胞表現型の変化を含む、請求項169～173のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項175】

前記寛容性が、T細胞の非共刺激活性化を含む、請求項1、2、5、6、23～43、50～142および169～174のいずれか一項に記載の方法。

【請求項176】

前記寛容性が、Treg応答の増強を含む、請求項1、2、5、6、23～43、50～142および169～175のいずれか一項に記載の方法。

【請求項177】

前記寛容性が、B細胞応答の減少を含む、請求項1、2、5、6、23～43、50～142および169～176のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 178】

前記 B 細胞応答の減少が、抗体産生の減少を含む、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 179】

前記寛容性が、サイトカイン産生の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～178 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 180】

前記寛容性が、自己免疫性応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～179 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 181】

前記寛容性が、アレルギー応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～180 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 182】

前記寛容性が、前記移植組織に対する免疫応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～181 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 183】

前記寛容性が、前記ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～182 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 184】

前記寛容性が、治療剤に対する免疫応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～183 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 185】

前記寛容性が、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む、請求項 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～184 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 186】

少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 回繰り返される、請求項 1～185 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 187】

前記方法の任意の 2 回の繰り返しの間の時間間隔が、少なくとも 1 日、1 週、1 カ月、2 カ月、3 カ月、4 カ月、5 カ月、6 カ月または 1 年である、請求項 186 に記載の方法。 30

【請求項 188】

請求項 1～43 および 50～187 のいずれか一項に記載の方法で使用するための、前記狭窄部、免疫細胞、抗原および／または寛容原性因子を含む系。

【請求項 189】

請求項 44～187 のいずれか一項に記載の方法で使用するための、前記狭窄部、免疫細胞および非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物を含む系。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2016 年 5 月 3 日に出願された米国仮出願第 62/331,384 号に対する優先権を請求し、その全体が、参照によって、本明細書に組み込まれる。 40

【0002】

本開示は、概して、細胞懸濁液を細胞変形狭窄部に通すことにより細胞中に化合物を送達することによって、免疫応答を抑制するかまたは寛容性を誘導するための方法に関する。

【背景技術】**【0003】**

望ましくない免疫応答は、自己免疫、移植拒絶反応、アレルギーおよび抗薬物応答に寄与する。生物体が抗自己応答を開始するときに、通常自己抗原に対する免疫応答の調節不全の結果として自己免疫が発生する。自己免疫疾患には、例えば、I 型糖尿病、全身性エ 50

リテマトーデス、関節リウマチ、自己免疫性溶血性貧血および多発性硬化症が含まれる。受容生物体にドナー器官を移植した後の病原性免疫応答は、移植片の拒絶反応および患者の生存期間の低下につながる可能性がある。さらに、食品抗原および環境抗原に対する望まれない免疫応答は、アレルギー性疾患、例えば喘息、食物アレルギーおよびアトピー性皮膚炎を促進する。したがって、抗原への免疫寛容を確立するアプローチは、熱心な治療的開発の焦点である。

【0004】

現在の細胞内送達方法は、抗原特異的寛容性を誘導するために細胞の表現型または機能をモジュレートするのに有効でない。したがって、自己免疫疾患および移植片拒絶反応の根底にある病原性免疫応答の処置のために、細胞の細胞質に抗原および寛容原性因子を送り込み、強力な免疫抑制応答を促進することができる細胞内送達技術に対する満たされていないニーズがある。細胞に化合物を送達するためにマイクロ流体狭窄部を使用する方法を記載する参考文献には、WO 2013059343、WO 2015023982、WO 2016070136、WO 2016077761およびPCT/US 2016/13113が含まれる。

【0005】

特許出願および公開を含む本明細書で引用される全ての参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2013/059343号

【特許文献2】国際公開第2015/023982号

【特許文献3】国際公開第2016/070136号

【特許文献4】国際公開第2016/077761号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原および／または寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、寛容原性免疫細胞が生成される、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性免疫細胞は、例えば該寛容原性免疫細胞による前記抗原の提示によって、該抗原への寛容性を誘導することが可能である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の活性および／もしくは発現をモジュレートし、免疫抑制分子の活性および／もしくは発現をモジュレートし、炎症性分子の活性および／もしくは発現をモジュレートし、ならびに／または別の免疫細胞の活性をモジュレートする (module)。

【0008】

本発明のある特定の態様は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原および／または寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、免疫抑制免疫細胞が生成される、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記免疫抑制免疫細胞による前記抗原の提示は、該抗原への免疫応答を抑制する。

【0009】

本発明のある特定の態様は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、抗原および／または寛容原性因子を含む免疫細胞を該個体に導入するステップを含み、該免疫細胞を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および／または該寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭

10

20

30

40

50

窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。

【0010】

本発明のある特定の態様は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、抗原および／または寛容原性因子を含む免疫細胞を該個体に導入するステップを含み、該免疫細胞を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および／または該寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。

【0011】

本発明のある特定の態様は、寛容原性免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法を提供する。

10

【0012】

本発明のある特定の態様は、免疫抑制免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法を提供する。

【0013】

本発明のある特定の態様は、寛容原性抗原提示免疫細胞を生成する方法であって、寛容原性免疫細胞が第2の狭窄部にさらに通され、ここで、抗原が該免疫細胞に入るように、該第2の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記寛容原性免疫細胞によって提示される。

20

【0014】

本発明のある特定の態様は、免疫抑制抗原提示免疫細胞を生成する方法であって、免疫抑制免疫細胞が第2の狭窄部にさらに通され、ここで、抗原が該免疫細胞に入るように、該第2の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記免疫抑制免疫細胞によって提示される。

【0015】

本発明のある特定の態様は、寛容原性抗原提示細胞を生成する方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、寛容原性因子が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子 (immunomodulatory agent) (例えば、免疫賦活因子 (immunostimulatory agent) (例えば、共刺激分子)、免疫抑制因子 (immunosuppressive agent) または炎症性もしくは抗炎症分子) の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、前記免疫抑制分子の導入の前に *in vitro* または *in vivo* で生成される。

30

【0016】

本発明のある特定の態様は、免疫抑制抗原提示細胞を生成する方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、寛容原性因子が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子 (例えば、免疫賦活因子 (例えば、共刺激分子)、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子) の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、前記寛容原性因子の導入の前に *in vitro* または *in vivo* で生成される。

40

【0017】

本発明のある特定の態様は、寛容原性表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該寛容原性因子と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子 (

50

例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

【0018】

本発明のある特定の態様は、免疫抑制表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、免疫抑制表現型を生成する該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該寛容原性因子と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

10

【0019】

本発明のある特定の態様は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、免疫抑制免疫細胞が生成される、ステップと、該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記第1または第2の免疫細胞による前記抗原の提示は、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体に同時に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体に逐次的に導入される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

20

【0020】

本発明のある特定の態様は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、寛容原性免疫細胞が生成される、ステップと、該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記第1のまたは第2の免疫細胞による前記抗原の提示は、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体に同時に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体に逐次的に導入される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

30

【0021】

本発明のある特定の態様は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が発現され、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が遊離炎症性サイトカインに結合し、それによって、例えば炎症性免疫細胞を阻害することによって免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、非機能的サイトカイン受容体を含む。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン受容体は、細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、標的サイトカインを切断するタンパク分解部位を含む。一部の実施形態で

40

50

は、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、抗サイトカイン抗体を含む。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、抗サイトカインB細胞受容体を含む。

【0022】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記免疫細胞は、前記個体に由来する。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、異なる個体に由来する。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、複数の個体に由来する細胞のプールに由来する。

【0023】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記狭窄部は、マイクロ流体チャネルの中に含有される。一部の実施形態では、前記狭窄部は孔であるか、または孔の中に含有される。一部の実施形態では、前記孔は、表面に含有される。一部の実施形態では、前記表面は、フィルターである。一部の実施形態では、前記表面は、膜である。一部の実施形態では、前記狭窄部サイズは、前記免疫細胞の直径の関数である。一部の実施形態では、前記狭窄部サイズは、前記細胞直径の約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約99%である。一部の実施形態では、前記チャネルは、約10 μ mの狭窄部長および約4 μ mの狭窄部幅を含む。一部では、前記孔径は、約0.4 μ m、約3 μ m、約4 μ m、約5 μ m、約8 μ m、約10 μ m、約12 μ mまたは約14 μ mである。一部の実施形態では、前記方法は、約-5℃～約45℃の間で実行される。

【0024】

特に明記しない限り、無核細胞の直径への言及は、狭窄部に通す前、例えば該細胞が該狭窄部に接近するときの液中の該細胞の直径を意味する。

【0025】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、混合細胞集団を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、全血である。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、末梢血単核細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、精製された細胞集団を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、哺乳動物細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、ヒト細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、非哺乳動物細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、細菌細胞、酵母細胞、ニワトリ細胞、カエル細胞、昆虫細胞、魚類細胞または線虫細胞を含む。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髓由来サプレッサー細胞または肥満細胞である。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞である。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、前記抗原提示細胞は、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髓由来サプレッサー細胞または肥満細胞である。

【0026】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記抗原は、外来抗原である。一部の実施形態では、前記抗原は、自己抗原である。一部の実施形態では、前記抗原は、同種移植抗原 (allograft transplantation antigen) である。一部の実施形態では、前記抗原は、修飾抗原である。一部の実施形態では、修飾抗原は、治療剤と融合した抗原を含む。一部の実施形態では、修飾抗原は、ターゲティングペプチドと融合し

10

20

30

40

50

た抗原を含む。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後抗原と接触する。

【0027】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の活性を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の発現を低下させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子の発現をモジュレートする核酸を欠失させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子のサプレッサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記共刺激分子は、CD80またはCD86である。

10

【0028】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫抑制因子の活性を増強する。一部の実施形態では、前記免疫抑制因子は、共阻害分子、転写レギュレーターまたは免疫抑制分子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の活性を増強する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の発現を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子をコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の発現を増加させるポリペプチドの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子のエンハンサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記共阻害分子は、PD-L1、PD-L2またはCTLA-4である。

20

【0029】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の活性を増強する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の発現を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子をコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の発現を増強するポリペプチドの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子のエンハンサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制分子は、アルギナーゼ1 (ARG1)、一酸化窒素 (NO)、一酸化窒素シンターゼ2 (NOS2)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN α またはTGF β である。

30

【0030】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、炎症性分子の活性を阻害する。一部の実施形態では、炎症性分子は、炎症性転写因子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、炎症性転写因子の発現を低下させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子をコードする核酸を欠失させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子のサプレッサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、炎症性転写因子は、NF- κ B、インターフェロン調節因子、またはJAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有する改変されたTC

40

50

Rをコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有するキメラ抗原受容体をコードする。

【0031】

以前の実施形態と組み合わせることができる一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、s i R N A、m R N A、m i R N A、l n c R N A、t R N Aまたはs h R N Aをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、プラスミドである。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、タンパク質核酸複合体を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、C a s ポリペプチドおよびガイドR N AまたはドナーD N Aを含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、C a s ポリペプチドおよびガイドR N AまたはドナーD N Aをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、C a s 9 ポリペプチドおよびガイドR N AまたはドナーD N Aを含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、ヌクレアーゼ、T A L E N タンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼまたはC R E リコンビナーゼである。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、トランスポザーゼまたはインテグラーゼ酵素である。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、抗体である。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、転写因子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、小分子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、ナノ粒子である。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後前記寛容原性因子と接触する。

【0032】

免疫応答が抑制される実施形態では、前記免疫応答は、少なくとも約25%、約50%、約75%、約100%、約150%、約200%または約200%を超えて抑制される。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、T細胞応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞活性化の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞生存の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞増殖の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞機能性の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞表現型の変化を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、T細胞の非共刺激活性化を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、T r e g 応答の増強を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、B細胞応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記B細胞応答の減少は、抗体産生の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、サイトカイン産生の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、自己免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、アレルギー応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、移植組織に関連した抗原である。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、前記移植組織に対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、ウイルスに関連する。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、細菌に関連する。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、前記細菌への病原性免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、真菌に関連する。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、前記真菌への病原性免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、治療剤に対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む。

【0033】

寛容性が誘導される実施形態では、前記寛容性は、T細胞応答の減少を含むことができる。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞活性化の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞生存の減少を含む。一部の実施形態では、

、前記 T 細胞応答の減少は、T 細胞増殖の減少を含む。一部の実施形態では、前記 T 細胞応答の減少は、T 細胞機能性の減少を含む。一部の実施形態では、前記 T 細胞応答の減少は、T 細胞表現型の変化を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、T 細胞の非共刺激活性化を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、T r e g 応答の増強を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、B 細胞応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記 B 細胞応答の減少は、抗体産生の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、サイトカイン産生の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、自己免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、アレルギー応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、移植組織に対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、前記ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、治療剤に対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記寛容性は、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む。

【0034】

改変された免疫細胞が個体に投与される一部の実施形態では、前記方法は、上記のとおり改変された免疫細胞の少なくとも 1 回の（例えば、少なくとも 2、3、4、5、6 回またはそれより多い）さらなる投与をさらに含む。一部の実施形態では、任意の 2 回の投与の間の時間間隔（duration of time）は、少なくとも 1 日、1 週、1 カ月、2 カ月、3 カ月、4 カ月、5 カ月、6 カ月または 1 年である。

【0035】

本発明のある特定の態様は、上記の方法のいずれか 1 つで使用するための、前記狭窄部、免疫細胞、抗原および／または寛容原性因子を含む系に関する。本発明のある特定の態様は、上記の方法のいずれか 1 つで使用するための、前記狭窄部、免疫細胞および非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物を含む系に関する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】図 1 は、処置スケジュールの図解を示す。

【0037】

【図 2】図 2 は、4 つの処置群からのマウスでの 12 日目の O T - I 特異的 T 細胞および O T - I I 特異的 T 細胞の数を示す。

【0038】

【図 3】図 3 は、高レベルの I F N - γ を発現した脾臓 T 細胞のパーセント（左）および I F N - γ 産生レベル（右）を示す。

【0039】

【図 4】図 4 は、E L I S p o t により決定した I F N - γ 産生 O T - I T 細胞の数を示す。

【0040】

【図 5】図 5 は、各処置群についての T C R V α 2 + 脾臓 O T - I T 細胞およびリンパ節 O T - I I T 細胞の代表的なフローサイトグラムを示す。

【0041】

【図 6】図 6 は、高い I F N - γ および C D 4 4 抗原活性化マーカーを有する O T - I 細胞の代表的なフローサイトグラムを示す。

【0042】

【図 7】図 7 は、処置スケジュールの図解を示す。

【0043】

【図 8】図 8 は、4 つの処置群からのマウスでの 12 日目の O T - I 特異的 T 細胞および O T - I I 特異的 T 細胞の数を示す。

【0044】

【図 9】図 9 は、高レベルの I F N - γ を発現した脾臓 T 細胞のパーセントを示す。

【0045】

【図 10】図 10 は、C D 8 + T 細胞と対比した O T - I T 細胞数（上図）の、およ

び C D 4 4 抗原活性化マーカーと対比した高 I F N - γ の細胞（下図）の代表的なフローサイトグラムを示す。

【0046】

【図11】図11Aおよび11Bは、代表的な処置スケジュールの図解を示す。

【0047】

【図12】図12Aおよび12Bは、代表的な処置スケジュールの図解を示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、免疫細胞を含有する細胞懸濁液を狭窄部に通し、該免疫細胞への抗原および／または寛容原性因子の送達を可能にすることによって、個体において寛容性を誘導するおよび／または免疫応答を抑制するための方法を提供する。一部の実施形態では、前記狭窄部は、マイクロ流体チャネルの中に含有される。一部の実施形態では、前記狭窄部は、孔であるかまたは孔の中に含有される。

10

【0049】

本開示のある特定の態様は、個体において抗原への寛容性を誘導するおよび／または抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップとを含む方法に関する。一部の実施形態では、寛容原性細胞における前記抗原の提示は、該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性環境で提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性環境でプロセッシングされる。一部の実施形態では、前記寛容性および／または免疫抑制は、抗原特異的である。一部の実施形態では、複数の抗原への寛容性および／または免疫応答の抑制を含めて、前記寛容性および／または免疫抑制は非特異的である。

20

【0050】

本開示のある特定の態様は、個体において抗原への寛容性を誘導するおよび／または抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入し、それによって該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制するステップとを含む方法に関する。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性環境で提示される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、寛容原性環境を生成し、ここで、該寛容原性環境での該抗原の提示は、該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性環境でプロセッシングされる。一部の実施形態では、前記寛容性および／または免疫抑制は、抗原特異的である。一部の実施形態では、複数の抗原への寛容性および／または免疫応答の抑制を含めて、寛容性および／または免疫抑制は非特異的である。

30

【0051】

本開示のある特定の態様は、個体において抗原への寛容性を誘導するおよび／または抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入し、それによって抗原への寛容性を誘導するおよび／または抗原への免疫応答を抑制するステップとを含む方法に関する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、寛容原性環境を生成し、ここで、該寛容原性環境での抗原の提示は、該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記寛容性および／または免疫抑制は、抗原特異的である。一部の実施形態では、複数の抗原への寛容性および／または免疫応答の抑制を含めて、前記寛容性および／または免疫抑制は非特異的である。

40

【0052】

50

本開示のある特定の態様は、寛容原性および／または免疫抑制抗原提示細胞を生成するための方法であって、該抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、寛容原性因子が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法に関する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

I. 一般技術

【0053】

本明細書で記載または参照される技術および手順は、一般によく理解されており、当業者によって従来の方法論、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、2012年)；Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubelら編、2003年)；Methods in Enzymologyシリーズ (Academic Press, Inc.)；PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson、B.D. HamesおよびG.R. Taylor編、1995年)；Antibodies, A Laboratory Manual (HarlowおよびLane編、1988年)；Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney、第6版、J. Wiley and Sons、2010年)；Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait編、1984年)；Methods in Molecular Biology, Humana Press；Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis編、Academic Press、1998年)；Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. MatherおよびP.E. Roberts、Plenum Press、1998年)；Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J.B. GriffithsおよびD.G. Newell編、J. Wiley and Sons、1993～8年)；Handbook of Experimental Immunology (D.M. WeirおよびC.C. Blackwell編、1996年)；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. MillerおよびM.P. Calos編、1987年)；PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullisら編、1994年)；Current Protocols in Immunology (J.E. Coliganら編、1991年)；Short Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、J. Wiley and Sons、2002年)；Immunobiology (C.A. Janewayら、2004年)；Antibodies (P. Finch、1997年)；Antibodies: A Practical Approach (D. Catty.編、IRL Press、1988～1989年)；Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. ShepherdおよびC. Dean編、Oxford University Press、2000年)；Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. HarlowおよびD. Lane、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999年)；The Antibodies (M. ZanettiおよびJ. D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995年)；およびCancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVitaら編、J.B. Lippincott Company、2011年)に記載される広く利用される方法論などを使用して普通に用いられる。

II. 定義

【0054】

この明細書の解釈のために、以下の定義が適用され、該当する限り、単数で使用される用語は複数形も含み、逆もまた同じである。下に示される任意の定義が参照により本明細書に組み込まれる任意の文献と矛盾する場合には、示される定義が優先される。

【0055】

本明細書で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、特に明記しない限り複数の参照物を含む。

【0056】

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態を「含む(comprising)」、「からなる(consisting)」および「から本質的になる(consisting essentially of)」ことを含むものと理解される。

10

20

30

40

50

【0057】

本明細書で使用される用語「約」は、この技術分野の当業者に容易に分かる、それぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書で「約」のついた値またはパラメーターへの言及は、その値またはパラメーター自体を対象とする実施形態を含む（および記載する）。

【0058】

本明細書で使用される用語「孔」は、材料の中の穴、裂け目、空洞、開口、亀裂、空隙または穿孔を限定されずに含む、開口部を指す。一部の例では、（示される場合）用語は本開示の表面の中の孔を指す。他の例では、（示される場合）孔は、細胞膜中の孔を指すことができる。

【0059】

本明細書で使用される用語「膜」は、孔を含有する選択的障壁またはシートを指す。用語は、境界またはライニングとして作用する柔軟なシート様構造を含む。一部の例では、用語は、孔を含有する表面またはフィルターを指す。この用語は、用語「細胞膜」とは異なる。

【0060】

本明細書で使用される用語「フィルター」は、孔を通した選択的通過を可能にする多孔性物品を指す。一部の例では、用語は、孔を含有する表面または膜を指す。

【0061】

本明細書で使用される用語「不均一な」は、構造または組成が混成しているかまたは均一でない物を指す。一部の例では、用語は、所与の表面の中の様々なサイズ、形または分布を有する孔を指す。

【0062】

本明細書で使用される用語「均一な」は、構造または組成全体が一貫しているかまたは均一である物を指す。一部の例では、用語は、所与の表面の中の一貫したサイズ、形または分布を有する孔を指す。

【0063】

本明細書で使用される用語「異種」は、異なる生物体に由来する分子を指す。一部の例では、用語は、所与の生物体の中で通常は見出されないかまたは発現されない核酸またはタンパク質を指す。

【0064】

本明細書で使用する場合、用語「阻害する」は、特定の標的の存在または活性を遮断する、低減する、排除する、さもなければ拮抗する作用を指すことができる。阻害は、部分的な阻害または完全な阻害を指すことができる。例えば、免疫応答を阻害することは、免疫応答の遮断、低減、排除または任意の他の拮抗につながる任意の作用を指すことができる。他の例では、核酸の発現の阻害には、これらに限定されないが、核酸の転写の低減、mRNA存在度の低減（例えば、mRNA転写サイレンシング）、mRNAの分解、mRNA翻訳の阻害などを含めることができる。他の例では、タンパク質の発現の阻害には、これらに限定されないが、タンパク質をコードする核酸の転写の低減、タンパク質をコードするmRNAの安定性の低減、タンパク質の翻訳の阻害、タンパク質の安定性の低減などを含めることができる。

【0065】

本明細書で使用する場合、用語「抑制する」は、特定の標的の存在または活性を低下させる、低減する、妨げる、制限する、減少させる、さもなければ減弱させる作用を指すことができる。抑制は、部分的な抑制または完全な抑制を指すことができる。例えば、免疫応答を抑制することは、免疫応答を低下させる、低減する、妨げる、制限する、減少させる、さもなければ減弱させることにつながる任意の作用を指すことができる。他の例では、核酸の発現の抑制には、これらに限定されないが、核酸の転写の低減、mRNA存在度の低減（例えば、mRNA転写サイレンシング）、mRNAの分解、mRNA翻訳の阻害などを含めることができる。他の例では、タンパク質の発現の抑制には、これらに限定されないが、タンパク質をコードする核酸の転写の低減、タンパク質をコードするmRNA

10

20

30

40

50

の安定性の低減、タンパク質の翻訳の阻害、タンパク質の安定性の低減などを含めることができる。

【0066】

本明細書で使用する場合、用語「増強する」は、特定の標的の存在または活性を向上させる、増進する、強化する、さもなければ増加させる行為を指すことができる。例えば、免疫応答を増強することは、免疫応答を向上させる、増進する、強化する、さもなければ増加させることにつながる任意の作用を指すことができる。他の例では、核酸の発現を増強することには、これらに限定されないが、核酸の転写の増加、mRNA存在度の増加（例えば、mRNAの転写の増加）、mRNAの分解の減少、mRNA翻訳の増加などを含めることができる。他の例では、タンパク質の発現を増強することには、これらに限定され

10

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「誘導する」は、結果を開始する、促進する、刺激する、確立する、さもなければ生じさせる作用を指すことができる。例えば、免疫応答を誘導することは、所望の免疫応答を開始する、促進する、刺激する、確立する、さもなければ生じさせることにつながる任意の作用を指すことができる。他の例では、核酸の発現を誘導することには、これらに限定されないが、核酸の転写の開始、mRNAの翻訳の開始などを含めることができる。他の例では、タンパク質の発現を誘導することには、これらに

20

【0068】

本明細書で使用される用語「同種」は、同じ生物体に由来する分子を指す。一部の例では、用語は、所与の生物体の中で通常見出されるかまたは発現される核酸またはタンパク質を指す。

【0069】

本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含む任意の長さのヌクレオチドのポリマー形を指す。したがって、この用語には、これらに限定されないが、一本鎖、二本鎖もしくは多重鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリン塩基およびピリミジン塩基を含むポリマー、または他の天然の、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基が含まれる。ポリヌクレオチドの骨格は、(RNAまたはDNAで一般的に見出され得る)糖およびリン酸基、または修飾もしくは置換された糖もしくはリン酸基を含むことができる。ポリヌクレオチドの骨格は、ペプチド結合によって連結される、N-(2-アミノエチル)-グリシンなどの反復単位を含むことができる(すなわち、ペプチド核酸)。あるいは、ポリヌクレオチドの骨格は、ホスホロアミデートなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、したがって、オリゴデオキシヌクレオシドホスホロアミデート(P-NH₂)または混合されたホスホロアミデート-ホスホジエステルオリゴマーであってよい。さらに、二本鎖ポリヌクレオチドは、相補鎖を合成し、適当な条件下で鎖をアニールすることによるか、または適当なプライマーによるDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を新規に合成することによるかのいずれかで、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド生成物から得ることができる。

30

40

【0070】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用され、最小長に限定されない。アミノ酸残基のそのようなポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含有することができ、これらに限定されないが、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体および多量体が含まれる。完全長タン

50

パク質およびその断片の両方は、定義により包含される。用語は、ポリペプチドの発現後の修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本発明のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然の配列への改変、例えば欠失、付加および置換（一般的に本来保存的な）を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通じて意図的であってもよく、または、例えばタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅によるエラーを通じて偶然であってもよい。

【0071】

本明細書に記載される構造的および機能的特徴のいずれかについて、これらの特徴を決定する方法は、当技術分野で公知である。

III. 免疫抑制および寛容性

【0072】

ある特定の態様では、本発明は、個体において免疫応答を抑制するおよび／または寛容性を誘導するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原および／または寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の損傷を引き起こし、寛容原性または免疫抑制免疫細胞が生成される、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が、該抗原への寛容性を誘導するおよび／または該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。

【0073】

寛容原性免疫細胞は、寛容原性の様式で抗原を提示する（例えば、該寛容原性免疫細胞による該抗原の提示は該抗原への寛容性を誘導する）ことが可能であり、または、別の細胞、例えば別の抗原提示細胞に寛容原性表現型を付与することが可能であり、それによって寛容原性抗原提示細胞を生成する免疫細胞として特徴付けられる。免疫抑制免疫細胞は、免疫抑制性の様式で抗原を提示する（例えば、免疫抑制免疫細胞による抗原の提示は該抗原への免疫応答を抑制する）ことが可能であり、または、別の細胞、例えば別の抗原提示細胞に免疫抑制表現型を付与することが可能であり、それによって免疫抑制抗原提示細胞を生成する免疫細胞として特徴付けられる。

【0074】

一部の実施形態では、本明細書に記載される寛容原性および／もしくは免疫抑制免疫細胞、またはその前駆体は、アジュバントと接触しなかった。一部の実施形態では、アジュバントは、パターン認識受容体（PRR）（例えば、*tol l*様受容体（TLR）、NOD様受容体（NLR）、RIG-I様受容体（RLR）およびC型レクチン受容体（CLR））、および病原体関連分子パターン（PAMP）のためのリガンドを含む。一部の実施形態では、アジュバントは、TLR3およびRLRリガンド（例えば、ポリ（I:C）などのdsRNAの合成類似体）、TLR4リガンド（例えば、リポ多糖（LPS）、モノホスホリルリポドA（MPLA））、TLR5リガンド（例えば、細菌性フラジェリン（単独または抗原に融合））、TLR7/8リガンド（例えば、イミダゾキノリン、例えばイミキモド、ガーディキモド、およびR848）、TLR9リガンド（例えば、特異的CpGモチーフを含有するオリゴデオキシヌクレオチド、例えば、ODN 1826およびODN 2006などのCpG ODN）、NOD2リガンド（例えば、細菌細胞壁断片、例えばムラミルジペプチド（MDP））、ミョウバン、油中水型エマルジョン（フロインド不完全アジュバント、MF59）、rhIL-2、抗CD40またはCD40L、IL-12ならびに環状ジヌクレオチドからなる群から選択される。

【0075】

一部の実施形態では、本明細書に記載される寛容原性および／または免疫抑制免疫細胞は、非寛容原性および／または非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の共刺激シグナルを提供する能力の低減を含む。一部の実施形態では、CD40、CD80、CD86、CD54、CD83、CD79またはICOSリガンドを通じたシグナル伝達を含む共刺激シグナル。

10

20

30

40

50

【0076】

一部の実施形態では、本明細書に記載される寛容原性および／または免疫抑制免疫細胞は、非寛容原性および／または非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の炎症性シグナルを提供する能力の低減を含む。一部の実施形態では、インターロイキン-1（IL-1）、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンガンマ（IFN-γ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、NF-κB、インターフェロン調節因子（IRF）またはJAK-STATを通じたシグナル伝達を含む炎症性シグナル。

【0077】

免疫寛容は、寛容性が誘導される抗原によるチャレンジへの、免疫学的不応答性である。寛容性は、寛容性誘導抗原による以降のチャレンジに対して被験体が不応答性であるときに実証される。寛容性は、自己反応性細胞のアポトーシス、アネルギーの誘導またはリンパ球表現型の偏向を含む、いくつかの異なる機構によって媒介されることがある。一部の実施形態では、前記寛容性は、特異抗原への免疫応答の脱活性化を引き起こすT細胞非応答性を含むことができる。寛容性は、免疫抑制サイトカインの分泌を通じた調節性T細胞（Treg）によって、および細胞表面分子または細胞傷害性因子との接触依存性相互作用を介して媒介される場合もある。寛容原性機構の欠陥は、自己免疫疾患、移植拒絶反応、抗薬物応答およびウイルス感染への病原性応答に寄与し得る。免疫抑制は、免疫応答の活性の減少である。例えば、免疫抑制には、限定されずに、抗原によるチャレンジへの応答性の減少、免疫細胞活性化および増殖の減少、モジュレートされたサイトカイン産生および／または分泌、免疫細胞生存の減少、または免疫細胞エフェクター機能の低下を含めることができる。

【0078】

一部の実施形態では、本発明は、免疫細胞への送達のための方法であって、該細胞が哺乳動物細胞である、方法を提供する。一部の実施形態では、前記細胞は、初代細胞、または細胞系細胞である。一部の実施形態では、前記細胞は、血液細胞である。一部の実施形態では、前記血液細胞は、免疫細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、リンパ球である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、樹状細胞（DC）、NKT細胞、肥満細胞、単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球または好中球である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、T細胞またはB細胞などの適応免疫細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、*ex vivo*で生成される細胞（例えば、*ex vivo*で生成される樹状細胞）である。例示的な*ex vivo*で生成される細胞には、幹細胞または前駆体細胞（例えば、自己幹細胞または前駆体細胞）から生成される免疫細胞が含まれる。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、自然免疫細胞である。例示的な自然免疫細胞には、自然リンパ球（ILC1、ILC2、ILC3）、好塩基球、好酸球、肥満細胞、NK細胞、好中球および単球が含まれる。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、記憶細胞である。一部の実施形態では、前記免疫細胞は、初代ヒトT細胞である。一部の実施形態では、前記細胞は、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヤギ細胞、サル細胞またはウサギ細胞である。一部の実施形態では、前記細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、非哺乳動物細胞を含む。一部の実施形態では、前記細胞は、ニワトリ細胞、カエル細胞、昆虫細胞、魚類細胞または線虫細胞である。

【0079】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が寛容原性免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記寛容原性免疫細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容原性免疫

細胞は、別の抗原提示細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛容原性抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該寛容原性抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容性は、抗原特異的である。

【0080】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップと、該寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記寛容原性免疫細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容原性免疫細胞は、別の抗原提示細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛容原性抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該寛容原性抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容性は、抗原特異的である。

10

【0081】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が免疫抑制免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記免疫抑制免疫細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制免疫細胞は、別の抗原提示細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該免疫抑制抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制は、抗原特異的である。

20

【0082】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記免疫抑制免疫細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制免疫細胞は、別の抗原提示細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該免疫抑制抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制は、抗原特異的である。

30

【0083】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該寛容原性免疫細胞が抗原を含み、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、ここで、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記寛容原性免疫細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容原性免疫細胞は、別の抗原提示細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛容原性抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、寛容原性抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形

40

50

態では、前記寛容性は、抗原特異的である。

【0084】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該寛容原性免疫細胞が抗原および寛容原性因子を含み、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部は該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記寛容原性免疫細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容原性免疫細胞は、別の抗原提示細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛容原性抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該寛容原性抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記寛容性は、抗原特異的である。

10

【0085】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫抑制免疫細胞が抗原を含み、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部は該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記免疫抑制免疫細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制免疫細胞は、別の抗原提示細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、該免疫抑制抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制は、抗原特異的である。

20

【0086】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫抑制免疫細胞が抗原および寛容原性因子を含み、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記免疫抑制免疫細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制免疫細胞は、別の抗原提示細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制抗原提示細胞を生成し、前記抗原は、前記免疫抑制抗原提示細胞によって提示されて、該抗原への免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、前記免疫抑制は、抗原特異的である。

30

【0087】

ある特定の態様では、本発明は、寛容原性免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって該寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法を提供する。ある特定の態様では、本発明は、寛容原性抗原提示免疫細胞を生成するための方法であって、該寛容原性免疫細胞が第2の狭窄部にさらに通され、ここで、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該第2の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該抗原が該寛容原性免疫細胞によって提示される、方法を提供する。

40

【0088】

50

ある特定の態様では、本発明は、免疫抑制免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって該免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法を提供する。ある特定の態様では、本発明は、免疫抑制抗原提示免疫細胞を生成するための方法であって、前記免疫抑制免疫細胞が第2の狭窄部にさらに通され、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該第2の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該抗原が該免疫抑制免疫細胞によって提示される、方法を提供する。

【0089】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫調節因子（例えば、共刺激分子、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性のモジュレーションを含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）の発現および／もしくは活性の阻害、免疫抑制因子の発現および／もしくは活性の増強、炎症性分子の発現および／もしくは活性の阻害、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性の増強を含む。

【0090】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）の発現および／または活性の阻害を含む。一部の実施形態では、前記免疫賦活因子は、共刺激分子である。最適なT細胞増殖および分化を刺激するためにTCRシグナル伝達を持続させ、統合するために、共刺激分子とそれらのリガンドの間の相互作用が重要である。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の発現の低下を含む。抗原提示細胞で発現される例示的な共刺激分子には、限定されずに、CD40、CD80、CD86、CD54、CD83、CD79またはICOSリガンドが含まれる。一部の実施形態では、前記共刺激分子は、CD80またはCD86である。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子を発現するかまたはその発現をモジュレートする核酸の発現の阻害を含む。一部の実施形態では、前記共刺激分子を発現するかまたはその発現をモジュレートする核酸は欠失している。一部の実施形態では、前記共刺激分子を発現するかまたはその発現をモジュレートする核酸の欠失は、遺伝子編集を介して達成される。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の阻害を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の発現または機能の阻害を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子の分解を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、破壊のための共刺激分子の標識を含む。例えば、免疫抑制および／または寛容性は、前記共刺激分子のユビキチン化を含むことができ、それによってそれを破壊の標的にする。

【0091】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫抑制因子の発現および／または活性の増強を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制因子は、共阻害分子、転写レギュレーターまたは免疫抑制分子である。共阻害分子は、リンパ球の活性化を負に調節する。例示的な共阻害分子には、限定されずに、PD-L1、PD-L2、HVEM、B7-H3、TRAIL、免疫グロブリン様転写物（ILT）受容体（ILT2、ILT3、ILT4）、FasL、CTLA4、CD39、CD73およびB7-H4が含まれる。一部の実施形態では、前記共阻害分子は、PD-L1またはPD-L2である。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共阻害分子の活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、共阻害分子の発現の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共阻害

分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記共阻害分子の発現を増加させるポリペプチドの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、共阻害分子のインヒビターの阻害を含む。

【0092】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫抑制分子の発現および／または活性の増加を含む。例示的な免疫抑制分子には、限定されずに、アルギナーゼ-1 (ARG1)、インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、プロスタグランジンE2 (PGE2)、誘導性一酸化窒素シンターゼ (iNOS)、一酸化窒素 (NO)、一酸化窒素シンターゼ2 (NOS2)、TSLP、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、肝細胞成長因子 (HGF)、TGF β 、IFN α 、IL-4、IL-10、IL-13およびIL-35が含まれる。一部の実施形態では、前記免疫抑制分子は、NOまたはIDOである。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記免疫抑制分子の活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記免疫抑制分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記免疫抑制分子の発現を増強するポリペプチドの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、免疫抑制分子の負のレギュレーターの阻害を含む。

【0093】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、炎症性分子の発現および／または活性の阻害を含む。一部の実施形態では、前記炎症性分子は、炎症性サイトカインである。一部の実施形態では、前記炎症性サイトカインは、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12およびIL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN-ガンマ) ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) から選択される。一部の実施形態では、前記炎症性分子は、炎症性転写因子である。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記炎症性転写因子の阻害を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、炎症性転写因子の発現の低下を含む。一部の実施形態では、前記炎症性転写因子は、NF- κ B、インターフェロン調節因子 (IRF)、またはJAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子である。前記NF- κ B経路は、サイトカイン、ケモカインおよび接着分子を含む炎症誘発性遺伝子の発現を媒介する原型的な炎症誘発性シグナル伝達経路である。インターフェロン調節因子 (IRF) は、炎症誘発性遺伝子の発現を調節することができる転写因子のファミリーを構成する。前記JAK-STATシグナル伝達経路は、細胞外サイトカインシグナルから核に情報を伝達し、免疫細胞の増殖および分化に関する遺伝子のDNA転写および発現をもたらす。前記JAK-STAT系は、細胞表面受容体、ヤヌスキナーゼ (JAK)、ならびにシグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) タンパク質からなる。例示的なJAK-STAT分子には、限定されずに、JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5 (STAT5AおよびSTAT5B) およびSTAT6が含まれる。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、サイトカインシグナル伝達 (SOCS) タンパク質のサブレッサーの発現の増強を含む。SOCSタンパク質は、JAK-STAT経路を通したシグナル伝達を阻害することができる。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、炎症性転写因子をコードする核酸の発現の阻害を含む。一部の実施形態では、前記炎症性転写因子をコードする核酸は、欠失している。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性の増加を含む。

【0094】

一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、抗炎症分子の発現および／または活性の増強を含む。一部の実施形態では、前記抗炎症分子は、抗炎症性サイトカ

インである。一部の実施形態では、前記抗炎症性サイトカインは、IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α およびトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF β)から選択される。一部の実施形態では、前記抗炎症分子は、抗炎症性転写因子である。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、抗炎症性転写因子の増強を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、抗炎症性転写因子の発現の増加を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記抗炎症性転写因子をコードする核酸の発現の増強を含む。一部の実施形態では、前記抗炎症性転写因子をコードする核酸は、欠失している。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記抗炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性の低下を含む。一部の実施形態では、前記免疫抑制および／または寛容性は、前記抗炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性の低下を含む。

【0095】

ある特定の態様では、本発明は、抗原を含む寛容原性抗原提示細胞を生成するための方法であって、寛容原性抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該抗原が該寛容原性抗原提示細胞に入り、それによって該抗原を含む該寛容原性抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。

【0096】

ある特定の態様では、本発明は、寛容原性抗原提示細胞を生成するための方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、寛容原性因子が該抗原提示細胞に入り、それによって該寛容原性抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

【0097】

ある特定の態様では、本発明は、抗原を含む寛容原性抗原提示細胞を生成するための方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該抗原および寛容原性因子が抗原提示細胞に入り、それによって該抗原を含む寛容原性抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

【0098】

ある特定の態様では、本発明は、抗原を含む免疫抑制抗原提示細胞を生成するための方法であって、免疫抑制抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該抗原が該免疫抑制抗原提示細胞に入り、それによって該抗原を含む該免疫抑制抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。

【0099】

ある特定の態様では、本発明は、免疫抑制抗原提示細胞を生成するための方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、寛容原性因子が該抗原提示細胞に入り、それによって該免疫抑制抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

【0100】

ある特定の態様では、本発明は、抗原を含む免疫抑制抗原提示細胞を生成するための方法であって、抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該抗原および寛容原性因子が該抗原提示細胞に入り、それによって該抗原を含む該免疫抑制抗原提示細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。

る。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。

【0101】

ある特定の態様では、本発明は、第1の免疫細胞（例えば、寛容原性免疫細胞）に抗原を送達するための方法であって、該第1の免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入るように、該狭窄部が該第1の免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該抗原と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、寛容原性因子は、本明細書に開示される方法によって前記第1の免疫細胞に送達され、それによって該第1の免疫細胞に寛容原性表現型を付与する。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で、例えば前記第1の免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で別の免疫細胞、例えば第2の免疫細胞、例えば第1の免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する免疫細胞、または、前記第1の免疫細胞から独立して寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、前記第1または第2の免疫細胞によって）クラス I MHC によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、前記第1または第2の免疫細胞によって）クラス II MHC によって提示される。

【0102】

ある特定の態様では、本発明は、寛容原性表現型を生成する寛容原性因子を第1の免疫細胞に送達するための方法であって、該第1の免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該寛容原性因子と接触し、それによって寛容原性免疫細胞を生成する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、抗原は、前記第1の免疫細胞または前記寛容原性免疫細胞による飲食運動によって取り込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法のいずれかによって、抗原は前記第1の免疫細胞または前記寛容原性免疫細胞に送達される。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で、例えば前記寛容原性免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で別の免疫細胞、例えば第2の免疫細胞、例えば前記寛容原性免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する免疫細胞、または、該寛容原性免疫細胞から独立して寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、該寛容原性免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラス I MHC によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、該寛容原性免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラス II MHC によって提示される。

【0103】

ある特定の態様では、本発明は、抗原および寛容原性表現型を生成する寛容原性因子を第1の免疫細胞に送達するための方法であって、該第1の免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原および該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該抗原および該寛容原性因子と接触し、それによって該抗原を含む該寛容原性免疫細胞を生成する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で、例えば前記寛容原性免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、寛容原性の様式で別の免疫細胞、例えば第

2の免疫細胞、例えば前記寛容原性免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する免疫細胞、または、該寛容原性免疫細胞から独立して寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、該寛容原性免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラスI MHCによって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、寛容原性免疫細胞によって（例えば、該寛容原性免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラスII MHCによって提示される。

【0104】

ある特定の態様では、本発明は、第1の免疫細胞（例えば、免疫抑制免疫細胞）に抗原を送達するための方法であって、該第1の免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入るように、該狭窄部が該第1の免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該抗原と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、寛容原性因子は、本明細書に開示される方法によって前記第1の免疫細胞に送達され、それによって該第1の免疫細胞に免疫抑制表現型を付与する。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で、例えば前記第1の免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で別の免疫細胞、例えば第2の免疫細胞、例えば前記第1の免疫細胞の特性によって付与される免疫抑制表現型を有する免疫細胞、または、該第1の免疫細胞から独立して免疫抑制表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、前記第1または第2の免疫細胞によって）クラスI MHCによって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、前記第1または第2の免疫細胞によって）クラスII MHCによって提示される。

【0105】

ある特定の態様では、本発明は、免疫抑制表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、免疫抑制表現型を生成する該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該寛容原性因子と接触し、それによって免疫抑制免疫細胞を生成する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、抗原は、前記第1の免疫細胞または前記免疫抑制免疫細胞による飲食運動によって取り込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法のいずれかによって、抗原は前記第1の免疫細胞または前記免疫抑制免疫細胞に送達される。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で、例えば前記免疫抑制免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で別の免疫細胞、例えば第2の免疫細胞、例えば前記免疫抑制免疫細胞の特性によって付与される免疫抑制表現型を有する免疫細胞、または、該免疫抑制免疫細胞から独立して寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、該免疫抑制免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラスI MHCによって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、該免疫抑制免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラスII MHCによって提示される。

【0106】

ある特定の態様では、本発明は、抗原および免疫抑制表現型を生成する寛容原性因子を第1の免疫細胞に送達するための方法であって、該第1の免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原および該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該抗原および該寛容原性因子と接触し、それによって該抗原を含

む免疫抑制免疫細胞を生成する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で、例えば前記免疫抑制免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、免疫抑制性の様式で別の免疫細胞、例えば第2の免疫細胞、例えば前記免疫抑制免疫細胞の特性によって付与される免疫抑制表現型を有する免疫細胞、または、該免疫抑制免疫細胞から独立して免疫抑制表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、該免疫抑制免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラス I MHCによって提示される。一部の実施形態では、前記抗原はプロセッシングされ、免疫抑制免疫細胞によって（例えば、該免疫抑制免疫細胞または前記第2の免疫細胞によって）クラス II MHCによって提示される。

【0107】

ある特定の態様では、本発明は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、免疫抑制免疫細胞が生成される、ステップと、該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原が免疫抑制性の様式で提示され、該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記第1の免疫細胞で提示される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記第2の免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、第3の免疫細胞、例えば、前記第2の免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記第3の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の特性とは無関係に、寛容原性表現型を有する（例えば、該第3の免疫細胞は、該個体への該第2の免疫細胞の導入の前に寛容原性表現型を有していた）。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および第2の免疫細胞は、同時に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体への導入の前に細胞懸濁液中で合わせられる。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および第2の免疫細胞は、逐次的に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の導入の前に前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の導入より前に、約1分、5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間または24時間のいずれかより長い時間、前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の免疫細胞は、前記第1の免疫細胞の導入の前に前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の免疫細胞は、前記第1の免疫細胞の導入より前に、約1分、5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間または24時間のいずれかより長い時間、前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の細胞への前記寛容原性因子の送達は、分泌機能を該第2の細胞に付与する。例えば、前記第2の細胞は、IL-4、IL-10、IL-13、IFN α および／またはTGF β を分泌することができ、それによって免疫抑制微小環境を増強する。一部の実施形態では、前記免疫抑制微小環境は、前記第1の細胞による抗原の寛容原性提示を可能にする。

【0108】

ある特定の態様では、本発明は、個体において抗原特異的寛容性を誘導するための方法であって、第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、抗

原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、寛容原性因子が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原が寛容原性の様式で提示され、該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記第1の免疫細胞で提示される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する。一部の実施形態では、前記抗原は、前記第2の免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記抗原は、第3の免疫細胞、例えば、前記第2の免疫細胞の特性によって付与される寛容原性表現型を有する免疫細胞によって提示される。一部の実施形態では、前記第3の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の特性とは無関係に、寛容原性表現型を有する（例えば、該第3の免疫細胞は、前記個体への該第2の免疫細胞の導入の前に寛容原性表現型を有していた）。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子または炎症性もしくは抗炎症分子）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および第2の免疫細胞は、同時に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および第2の免疫細胞は、逐次的に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞は、前記個体への導入の前に細胞懸濁液中で合わせられる。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の導入の前に前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第1の免疫細胞は、前記第2の免疫細胞の導入より前に、約1分、5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間または24時間のいずれかより長い時間、前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の免疫細胞は、前記第1の免疫細胞の導入の前に前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の免疫細胞は、前記第1の免疫細胞の導入より前に、約1分、5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間または24時間のいずれかより長い時間、前記個体に導入される。一部の実施形態では、前記第2の細胞への前記寛容原性因子の送達は、分泌機能を該第2の細胞に付与する。例えば、前記第2の細胞は、IL-4、IL-10、IL-13、IFN α および／またはTGF β を分泌することができ、それによって免疫抑制微小環境を増強する。一部の実施形態では、前記免疫抑制微小環境は、前記第1の細胞による抗原の寛容原性提示を可能にする。

【0109】

ある特定の態様では、本発明は、個体において免疫応答を抑制するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が発現され、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が遊離炎症性サイトカインに結合し、それによって免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法を提供する。例えば、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、遊離炎症性サイトカインに結合および／またはそれを隔離することができ、それによってそれらが機能的サイトカイン受容体に結合して下流のシグナル伝達を誘発することを阻止する。一部の実施形態では、前記サイトカインは、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質の内在化および細胞内プロセッシングによって破壊される。一部の実施形態では、非機能的サイトカイン結合タンパク質は、非機能的サイトカイン受容体を含む。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン受容体は、細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、標的サイトカインを切断するタンパク分解部位を含む。例えば、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、結合の後に前記サイトカインを切断または分解する酵素を含有することができる。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、抗サイト

カイン抗体を含む。一部の実施形態では、前記非機能的サイトカイン結合タンパク質は、B細胞受容体を含む。前記非機能的サイトカイン受容体によって結合することができる例示的なサイトカインには、限定されずに、IL-2、IL-6、TNF α 、IL-1およびIFN γ が含まれる。

【0110】

一部の実施形態では、前記免疫応答は、少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約90%または約100%のいずれかまで抑制される。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、T細胞応答の減少を含む。例えば、T細胞応答の減少には、限定されずに、T細胞活性化もしくは増殖の減少、T細胞生存の減少、または細胞機能性の減少を含めることができる。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞活性化の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞増殖の減少を含む。一部の実施形態では、前記T細胞応答の減少は、T細胞機能性の減少を含む。例えば、T細胞機能性の減少には、限定されずに、サイトカイン分泌のモジュレーション、炎症部位へのT細胞移動の減少およびT細胞細胞傷害活性の低下を含めることができる。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、炎症性サイトカインの産生および／もしくは分泌の減少、ならびに／または抗炎症性サイトカインの産生および／もしくは分泌の増加を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12およびIL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN- γ) ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) から選択される1つまたは複数の炎症性サイトカインの産生および／または分泌の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN- α およびトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF β) から選択される1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの産生および／または分泌の減少を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、T細胞表現型の変化を含む。例えば、前記T細胞の状態は、炎症誘発性表現型から調節性または抗炎症性の表現型に変化することができる。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、T細胞の非共刺激活性化を含み、それは細胞死にその後つながる可能性がある。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、調節性T細胞 (Treg) 応答の増強を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、調節性B細胞 (Breg)、寛容原性単球、骨髄由来サプレッサー細胞または寛容原性マクロファージ応答の増強を含む。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、B細胞応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記B細胞応答の減少は、抗体産生の減少を含む。

【0111】

一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、自己免疫応答の減少を含む。例えば、前記自己免疫応答の減少には、限定されずに、I型糖尿病、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、クローン病または潰瘍性大腸炎に関連した抗原に対する免疫応答の減少または寛容性の誘導を含めることができる。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、アレルギー応答の減少を含む。例えば、前記アレルギー応答の減少には、アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎 (花粉症) または食物アレルギーに関連した抗原に対する免疫応答の減少または寛容性の誘導を含めることができる。一部の実施形態では、前記抗原は、移植組織に関連した抗原である。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、前記移植組織に対する免疫応答の減少または寛容性の誘導を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、ウイルスに関連する。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、前記ウイルスへの病原性免疫応答

の減少または寛容性の誘導を含む。例えば、病原性免疫応答には、ある特定のウイルス感染によって生成されるサイトカインストームを含めることができる。サイトカインストームは、サイトカインと白血球の間の正のフィードバックループからなる潜在的に致命的な免疫反応である。

【0112】

一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、治療剤に対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記治療剤は凝固因子である。例示的な凝固因子には、限定されずに、第V因子および第IX因子が含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、抗体である。例示的な治療抗体には、限定されずに、抗TNF α 、抗VEGF、抗CD3、抗CD20、抗IL-2R、抗Her2、抗RSVF、抗CEA、抗IL-1ベータ、抗CD15、抗ミオシン、抗PSMA、抗40kDa糖タンパク質、抗CD33、抗CD52、抗IgE、抗CD11a、抗EGFR、抗C5、抗アルファ4インテグリン、抗IL-12/IL-23、抗IL-6Rおよび抗RANKLが含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、成長因子である。例示的な治療成長因子には、限定されずに、エリスロポイエチン（EPO）ならびに巨核球の分化および成長因子（MDGF）が含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、ホルモンである。例示的な治療ホルモンには、限定されずに、インスリン、ヒト成長ホルモンおよび卵胞刺激ホルモンが含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、組換えサイトカインである。例示的な治療組換えサイトカインには、限定されずに、IFN β 、IFN α およびGM-CSFが含まれる。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答は、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む。一部の実施形態では、前記治療ビヒクルは、遺伝子療法のために使用されるウイルス、例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、バキュロウイルス、ヘルペスウイルスまたはレトロウイルスである。一部の実施形態では、前記治療ビヒクルは、脂質をベースとしたビヒクル、例えばリポソームである。一部の実施形態では、前記治療ビヒクルは、ナノ粒子である。

【0113】

IV. 細胞を変形させる狭窄部を提供するためのマイクロ流体チャネル

一部の実施形態では、本発明は、細胞懸濁液を狭窄部に通すことによって免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導する方法であって、抗原または寛容原性因子が免疫細胞に入るように、マイクロ流体チャネルの中に含有される該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、複数の狭窄部が、前記マイクロ流体チャネルの中に並列的におよび／または直列的に配置されていてもよい。本明細書に開示する方法に使用するための細胞を変形させる狭窄部を含有する例示的なマイクロ流体チャネルは、WO2013059343に記載されている。本明細書に開示する方法に使用するための孔を有する例示的な表面は、2015年9月4日出願された米国仮出願第62/214,820号に記載されている。

【0114】

一部の実施形態では、前記マイクロ流体チャネルは内腔を含み、かつ緩衝液中に懸濁された細胞が通過できるように構成されており、該マイクロ流体チャネルは狭窄部を含む。前記マイクロ流体チャネルは、シリコン、金属（例えば、ステンレス鋼）、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、セラミック、ガラス、結晶性基材、非晶性基材、またはポリマー（例えば、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、PDMS、環状オレフィンポリマー（COC）など）などの多数の材料のうちのいずれか1つから作られたものであってよい。前記マイクロ流体チャネルの製作は、ドライエッチング、ウェットエッチング、フォトリソグラフィー、射出成形、レーザーアブレーション、またはSU-8マスクなどの当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。

【0115】

一部の実施形態では、前記マイクロ流体チャネルの中の前記狭窄部は、入口部分、中央部分、および出口部分を含む。一部の実施形態では、前記マイクロ流体チャネルの中の前記狭窄部の長さ、深さ、および幅は、変わり得る。一部の実施形態では、前記マイクロ流

体チャネルの中の前記狭窄部の直径は、前記細胞または細胞クラスターの直径の関数である。一部の実施形態では、前記マイクロ流体チャネルの中の前記狭窄部の直径は、前記細胞の直径の約20%から約99%である。一部の実施形態では、前記狭窄部サイズは、前記細胞の直径の約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約99%である。一部の実施形態では、前記狭窄部サイズは、前記細胞の最小断面距離の約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約99%である。一部の実施形態では、前記チャネルは、約2 μm から約10 μm の間の狭窄部幅またはこれらの間の任意の幅もしくは幅の範囲を含む。例えば、前記狭窄部幅は、約2 μm 、約3 μm 、約4 μm 、約5 μm 、約6 μm 、または約7 μm のうちのいずれか1つであってよい。一部の実施形態では、前記チャネルは、約10 μm の狭窄部長および約4 μm の狭窄部幅を含む。前記チャネル、前記入口部分、前記中央部分、および前記出口部分の断面も変動してよい。例えば、前記断面は、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形、または三角形の形状であってよい。前記入口部分は狭窄部角度を規定し、該狭窄部角度は前記チャネルの詰まりを低減するように最適化され、かつ前記細胞への化合物の送達を増強するために最適化される。前記出口部分の角度も変動してよい。例えば、前記出口部分の角度は、非層流を生じさせ得る乱流の可能性を低減するように構成される。一部の実施形態では、前記入口部分および／または前記出口部分の壁は直線状である。その他の実施形態では、前記入口部分および／または前記出口部分の壁は湾曲している。

10

【0116】

20

V. 細胞を変形させる狭窄部を提供するための孔を有する表面

一部の実施形態では、本発明は、細胞懸濁液を狭窄部に通すことによって免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導する方法であって、抗原および／または寛容原性因子が免疫細胞に入るように、孔であるか、または孔の中に含有される該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法を提供する。一部の実施形態では、前記孔は表面に含有される。本明細書に開示する方法に使用するための孔を有する例示的な表面は、2015年9月4日に出願された米国仮出願第62/214,820号に記載されている。

【0117】

本明細書に開示する表面は、いくつかの材料のいずれか1つから作られたものであってよく、またいくつかの形態のいずれか1つを取ることができる。一部の実施形態では、前記表面はフィルターである。一部の実施形態では、前記表面は膜である。一部の実施形態では、前記フィルターはタンジェンシャルフローフィルターである。一部の実施形態では、前記表面はスポンジまたはスポンジ様マトリックスである。一部の実施形態では、前記表面はマトリックスである。

30

【0118】

一部の実施形態では、前記表面は、曲がりくねった経路の表面である。一部の実施形態では、前記曲がりくねった経路の表面は酢酸セルロースを含む。一部の実施形態では、前記表面は、以下に限定されないが、合成または天然ポリマー、ポリカーボネート、シリコン、ガラス、金属、合金、硝酸セルロース、銀、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエステル、ポリエーテルスルホン、ポリアクリロニトリル(PAN)、ポリプロピレン、PVDF、ポリテトラフルオロエチレン(polytetrafluorethylene)、混合セルロースエステル、磁器、およびセラミックから選択される材料を含む。

40

【0119】

本明細書に開示する表面は、当技術分野で公知の任意の形状、例えば三次元形状を有することができる。前記表面の二次元形状は、以下に限定されないが、円形、楕円、丸形、四角形、星形、三角形、多角形、五角形、六角形、七角形、または八角形であってよい。一部の実施形態では、前記表面は丸形の形状である。一部の実施形態では、前記表面の三次元形状は、円筒形、円錐形、または立方体である。

【0120】

50

前記表面は、様々な断面幅および断面厚さを有することができる。一部の実施形態では、前記表面の断面幅は約 1 mm から約 1 m の間またはこれらの間の任意の断面幅もしくは断面幅の範囲である。一部の実施形態では、前記表面は、規定された厚さを有する。一部の実施形態では、前記表面の厚さは均一である。一部の実施形態では、前記表面の厚さは可変である。例えば、一部の実施形態では、前記表面の部分は、該表面のその他の部分よりも厚いまたは薄い。一部の実施形態では、前記表面の厚さは、約 1 % から約 90 % またはこれらの間の任意のパーセンテージもしくはパーセンテージの範囲で変動する。一部の実施形態では、前記表面は、約 0.01 μm から約 5 mm の厚さまたはこれらの間の任意の厚さもしくは厚さの範囲である。

【0121】

一部の実施形態では、前記狭窄部は、孔であるか、または孔の中に含有される。前記孔の断面幅は、処理される細胞の種類に関係する。一部の実施形態では、前記孔径は、処理される細胞または細胞クラスターの直径の関数である。一部の実施形態では、前記孔径は、細胞が該孔を通過する際に摂動されるようなものである。一部の実施形態では、前記孔径は前記細胞の直径未満である。一部の実施形態では、前記孔径は、前記細胞の直径の約 10 % から約 99 % である。一部の実施形態では、前記孔径は、前記細胞の直径の約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、または約 99 % である。最適な孔径または孔の断面幅は、応用および／または細胞型に基づいて変動し得る。一部の実施形態では、前記孔径は約 2 μm から約 14 μm である。一部の実施形態では、前記孔径は、約 2 μm 、約 3 μm 、約 4 μm 、約 5 μm 、約 8 μm 、約 10 μm 、約 12 μm 、または約 14 μm である。一部の実施形態では、前記断面幅は約 2 μm から約 14 μm である。一部の実施形態では、前記孔の断面は、約 2 μm 、約 3 μm 、約 4 μm 、約 5 μm 、約 8 μm 、約 10 μm 、約 12 μm 、または約 14 μm である。

【0122】

前記孔の通路の入口および出口は様々な角度を有してもよい。前記孔の角度は、細胞が通過している間の孔の詰まりを最小化するように選択することができる。一部の実施形態では、前記表面を通る流速は、約 0.001 mL/cm²/秒から約 100 L/cm²/秒の間またはこれらの間の任意の速度もしくは速度の範囲である。例えば、前記入口部分または出口部分の角度は約 0° から約 90° の間であってもよい。一部の実施形態では、入口部分または出口部分は 90° より大きくてもよい。一部の実施形態では、前記孔は、同一の入口角度および出口角度を有する。一部の実施形態では、前記孔は、異なる入口角度および出口角度を有する。一部の実施形態では、前記孔の縁部は滑らかであり、例えば丸形であるかまたは湾曲している。滑らかな孔の縁部は、出っ張り、隆起、または凹凸の部分なしで、連続的な、平らな、かつ凹凸のない表面を有する。一部の実施形態では、前記孔の縁部はとがっている。とがった孔の縁部は、とがったまたは鋭角の細い縁を有する。一部の実施形態では、前記孔の通路は直線的である。直線的な孔の通路は、湾曲、屈曲、角度、またはその他の不規則性を含有しない。一部の実施形態では、前記孔の通路は湾曲している。湾曲した孔の通路は、屈曲しているか、または直線から逸脱している。一部の実施形態では、前記孔の通路は、複数の湾曲、例えば、約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くの湾曲を有する。

【0123】

前記孔は、二次元または三次元形状などの当技術分野で公知の任意の形状を有することができる。前記孔の形状（例えば、前記断面形状）は、以下に限定されないが、円形、楕円、丸形、四角形、星形、三角形、多角形、五角形、六角形、七角形、および八角形であってもよい。一部の実施形態では、前記孔の断面は丸形の形状である。一部の実施形態では、前記孔の三次元形状は円筒形または円錐形である。一部の実施形態では、前記孔は、溝付きの入口および出口の形状を有する。一部の実施形態では、前記孔の形状は、所与の表面の中の孔の間で均一（すなわち、一貫したまたは規則的）である。一部の実施形態では、前記孔の形状は、所与の表面の中の孔の間で不均一（すなわち、混合的または可変）

である。

【0124】

本明細書に記載する表面は、広範な合計の孔数を有することができる。一部の実施形態では、前記孔は、総表面積の約10%から約80%に及ぶ。一部の実施形態では、前記表面は、合計で約 1.0×10^5 個から約 1.0×10^{30} 個の孔またはこれらの間の任意の数または数の範囲を含有する。一部の実施形態では、前記表面は、 1 mm^2 の表面積あたり約10から約 1.0×10^{15} 個の孔を含む。

【0125】

前記孔は、所与の表面の中で多数の様式で分布することができる。一部の実施形態では、前記孔は、所与の表面の中で並列に分布する。一つのそのような例では、前記孔は、同一方向に並んで分布し、かつ所与の表面の中で同じ距離だけ離れている。一部の実施形態では、前記孔の分布は、規則正しいまたは均一である。一つのそのような例では、前記孔は、規則的な系統的パターンで分布しており、または所与の表面の中で同じ距離だけ離れている。一部の実施形態では、前記孔の分布は、ランダムまたは不均一である。一つのそのような例では、前記孔は、不規則で無秩序なパターンで分布しており、または所与の表面の中で異なる距離だけ離れている。一部の実施形態では、複数の表面が、列をなして分布する。前記複数の表面は、表面サイズ、形状、および／または粗さについて均一または不均一であってよい。前記複数の表面は、均一または不均一な孔径、形状、および／または数の孔をさらに含有し、それによって異なる細胞型への一連の化合物の同時の送達を可能とすることができる。

【0126】

一部の実施形態では、個々の孔は、一様な幅寸法（すなわち、該孔の通路の長さに沿って一定の幅）を有する。一部の実施形態では、個々の孔は、可変の幅（すなわち、該孔の通路の長さに沿って増加または減少する幅）を有する。一部の実施形態では、所与の表面の中の孔は、同じ個々の孔の深さを有する。一部の実施形態では、所与の表面の中の孔は、異なる個々の孔の深さを有する。一部の実施形態では、前記孔は、互いにすぐ隣にある。一部の実施形態では、前記孔は、ある距離だけ互いに離れている。一部の実施形態では、前記孔は、約 $0.001\text{ }\mu\text{m}$ から約 30 mm の距離またはこれらの間の任意の距離もしくは距離の範囲だけ互いに離れている。

【0127】

一部の実施形態では、前記表面は材料でコーティングされている。前記材料は、以下に限定されないが、Teflon、粘着剤コーティング、界面活性剤、タンパク質、接着分子、抗体、抗凝固剤、細胞機能をモジュレートする因子、核酸、脂肪、炭水化物、または膜貫通タンパク質などの当技術分野で公知の任意の材料から選択することができる。一部の実施形態では、前記表面はポリビニルピロリドンでコーティングされている。一部の実施形態では、前記材料は前記表面に共有結合的に付着している。一部の実施形態では、前記材料は前記表面に非共有結合的に付着している。一部の実施形態では、前記表面分子は、前記細胞が前記孔を通過する際に放出される。

【0128】

一部の実施形態では、前記表面は、改質された化学的特性を有する。一部の実施形態では、前記表面は極性である。一部の実施形態では、前記表面は親水性である。一部の実施形態では、前記表面は非極性である。一部の実施形態では、前記表面は疎水性である。一部の実施形態では、前記表面は帯電している。一部の実施形態では、前記表面は正および／または負に帯電している。一部の実施形態では、前記表面は、一部の領域で正に帯電し、かつその他の領域で負に帯電していてもよい。一部の実施形態では、前記表面は、全体として正または全体として負の電荷を有する。一部の実施形態では、前記表面は、平滑であるか、電解研磨されているか、粗いか、またはプラズマ処理されているかのいずれか1つであってもよい。一部の実施形態では、前記表面は、両性イオンまたは二極性化合物を含む。一部の実施形態では、前記表面はプラズマ処理されている。

【0129】

一部の実施形態では、前記表面は、より大きなモジュールの中に含有される。一部の実施形態では、前記表面は、プラスチックまたはガラスシリンジなどのシリンジの中に含有される。一部の実施形態では、前記表面は、プラスチックフィルターホルダーの中に含有される。一部の実施形態では、前記表面は、ピペットチップの中に含有される。

【0130】

VI. 細胞の摂動

一部の実施形態では、本発明は、細胞懸濁液を狭窄部に通すことによって免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導する方法であって、抗原または寛容原性因子が免疫細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、ここで、該細胞の該摂動が、材料が該細胞の外側から該細胞の中に移動するのを可能にする該細胞の破れ口 (breach) (例えば、穴、裂け目、空洞、開口、孔、破れ、空隙、穿孔) である、方法を提供する。前記変形は、例えば、機械的歪みおよび/またはせん断力によって誘導された圧力によって引き起こすことができる。一部の実施形態では、前記摂動は前記細胞膜の中の摂動である。一部の実施形態では、前記摂動は一時的なものである。一部の実施形態では、前記細胞の摂動は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 2 時間またはこれらの間の任意の時間もしくは時間の範囲にわたって続く。一部の実施形態では、前記細胞の摂動は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1 秒、約 1 秒から約 1 分、または約 1 分から約 1 時間にわたって続く。一部の実施形態では、前記細胞の摂動は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-2} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-3} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-4} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-5} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-6} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-7} 秒、または約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-8} 秒のいずれか 1 つの間にわたって続く。一部の実施形態では、前記細胞の摂動は、約 1.0×10^{-8} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-7} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-6} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-5} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-4} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-3} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、または約 1.0×10^{-2} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒のいずれか 1 つにわたって続く。本明細書に記載する方法によって作られた前記細胞の摂動 (例えば、孔または穴) は、補体 (complement) または細菌ヘモリシンによって作られるものなどの多量体の孔構造物を形成するタンパク質サブユニットのアセンブリーの結果として形成されるものではない。

【0131】

前記細胞が前記狭窄部を通過する際に該狭窄部は該細胞膜に一時的に損傷を与え、それが前記摂動を通じて材料の受動拡散を引き起こす。一部の実施形態では、細胞のシグナル伝達機構を通じてアポトーシス経路を活性化する可能性を最小化するために、前記細胞は $100 \mu s$ のオーダーの短期間のみ変形するが、その他の継続期間も可能である (例えば、数ナノ秒から数時間かに及ぶ)。一部の実施形態では、前記細胞は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 2 時間またはこれらの間の任意の時間もしくは時間の範囲にわたって変形する。一部の実施形態では、前記細胞は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1 秒、約 1 秒から約 1 分、または約 1 分から約 1 時間にわたって変形する。一部の実施形態では、前記細胞は、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-2} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-3} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-4} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-5} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-6} 秒、約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-7} 秒、または約 1.0×10^{-9} 秒から約 1.0×10^{-8} 秒のいずれか 1 つの間にわたって変形する。一部の実施形態では、前記細胞は、約 1.0×10^{-8} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-7} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-6} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-5} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-4} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、約 1.0×10^{-3} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒、または約 1.0×10^{-2} 秒から約 1.0×10^{-1} 秒のいずれか 1 つにわたって変形する

。一部の実施形態では、前記細胞を変形させることは、以下に限定されないが、約 $1\ \mu\text{s}$ から少なくとも約 $750\ \mu\text{s}$ に及ぶ時間、例えば、少なくとも約 $1\ \mu\text{s}$ 、 $10\ \mu\text{s}$ 、 $50\ \mu\text{s}$ 、 $100\ \mu\text{s}$ 、 $500\ \mu\text{s}$ 、または $750\ \mu\text{s}$ にわたって該細胞を変形させることを含む。

【0132】

一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞による前記狭窄部の通過および／または該細胞の摂動と同時に起こる。一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過した後に起こる。一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過してから分のオーダーで起こる。一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から少なくとも約 30 分後に起こる。例えば、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 秒後、約 1 秒から約 1 分後、または約 1 分から約 30 分後に起こる。一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から約 10 分後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 5 分後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 分後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 50 秒後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 10 秒後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 秒後、または約 1.0×10^{-2} 秒から約 0.1 秒後に起こる。一部の実施形態では、前記細胞への前記化合物の通過は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-1} 秒から約 10 分後、約 1 秒から約 10 分後、約 10 秒から約 10 分後、約 50 秒から約 10 分後、約 1 分から約 10 分後、または約 5 分から約 10 分後に起こる。一部の実施形態では、前記細胞が前記狭窄部を通過した後の該細胞の摂動は、該細胞が該狭窄部を通過してから約 5 分のオーダー以内に矯正される。

【0133】

一部の実施形態では、前記狭窄部を通過した後の前記細胞生存率は、約 5 % から約 100 % である。一部の実施形態では、前記狭窄部を通過した後の前記細胞生存率は、少なくとも約 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 99 % である。一部の実施形態では、前記細胞生存率は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から少なくとも約 10 日後に測定される。例えば、前記細胞生存率は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 秒後、約 1 秒から約 1 分後、約 1 分から約 30 分後、または約 30 分から約 2 時間後に測定される。一部の実施形態では、前記細胞生存率は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.0×10^{-2} 秒から約 2 時間後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 時間後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 30 分後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 分後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 30 秒後、約 1.0×10^{-2} 秒から約 1 秒後、または約 1.0×10^{-2} 秒から約 0.1 秒後に測定される。一部の実施形態では、前記細胞生存率は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 1.5 時間から約 2 時間後、約 1 時間から約 2 時間後、約 30 分から約 2 時間後、約 15 分から約 2 時間後、約 1 分から約 2 時間後、約 30 秒から約 2 時間後、または約 1 秒から約 2 時間後に測定される。一部の実施形態では、前記細胞生存率は、該細胞が前記狭窄部を通過してから約 2 時間から約 5 時間後、約 5 時間から約 12 時間後、約 12 時間から約 24 時間後、または約 24 時間から約 10 日後に測定される。

【0134】

VII. 送達のパラメーター

本明細書に記載する方法によって免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための細胞への化合物の送達にはいくつかのパラメーターが影響し得る。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後に前記化合物と接触させられる。前記細胞は、送達するための前記化合物を含む溶液中に懸濁されて前記狭窄部を通過してもよいが、該細胞が該狭窄部を通過した後に該化合物を前記細胞懸濁液に加えてもよい。一部の実施形態では、送達される前記化合物は前記狭窄部上でコーティングされる。

10

20

30

40

50

【0135】

前記細胞への前記化合物の送達に影響し得るパラメーターの例としては、以下に限定されないが、前記狭窄部の寸法、該狭窄部の入口角度、該狭窄部の表面特性（例えば、粗さ、化学修飾、親水性、疎水性など）、作動する流速（operating flow speed）（例えば、該狭窄部を通る細胞通過時間）、該細胞濃度、該細胞懸濁液中の該化合物濃度が挙げられ、また、該狭窄部を通過した後に該細胞を回収またはインキュベートする時間量は、該細胞に送達される該化合物の通過に影響し得る。前記細胞への前記化合物の送達に影響する追加のパラメーターとしては、前記狭窄部中での該細胞の速度、該狭窄部中でのせん断速度、該細胞懸濁液の粘度、流れ速度に垂直な速度成分、および該狭窄部中での時間を挙げることができる。前記化合物の送達を制御するためにそのようなパラメーターを設計することができる。一部の実施形態では、前記細胞濃度は、1 mlあたり約10から少なくとも約 10^{12} 個の細胞またはこれらの間の任意の濃度もしくは濃度の範囲に及ぶ。一部の実施形態では、送達化合物の濃度は、約10 ng/mlから約1 g/mLまたはこれらの間の任意の濃度もしくは濃度の範囲に及ぶことができる。一部の実施形態では、送達化合物の濃度は、約1 pMから少なくとも約2 Mまたはこれらの間の任意の濃度もしくは濃度範囲に及ぶことができる。

10

【0136】

本開示の方法に使用される温度を調整して、化合物の送達および細胞生存率に影響を及ぼすことができる。一部の実施形態では、本方法は、約 -5°C から約 45°C の間で実行される。例えば、本方法は、室温（例えば、約 20°C ）、生理的温度（例えば、約 37°C ）、生理的温度より高い温度（例えば、約 37°C より高い温度から 45°C またはさらに高い温度）、または低下させた温度（例えば、約 -5°C から約 4°C ）、あるいはこれらの例示的な温度の間の温度で実行することができる。

20

【0137】

様々な方法を利用して、前記細胞が前記狭窄部を通るのを推進することができる。例えば、前記入口側にポンプによって圧力を加えてもよく（例えば、ガスシリンダーまたはコンプレッサー）、前記出口側に真空ポンプによって真空を適用してもよく、チューブを通じて毛管作用を適用してもよく、かつ／または前記系は重力供給してもよい。排出ベースのフローシステム（displacement based flow system）を使用することもできる（例えば、シリンジポンプ、蠕動運動ポンプ、手動のシリンジまたはピペット、ピストンなど）。一部の実施形態では、前記細胞は、陽圧または陰圧によって前記狭窄部に通される。一部の実施形態では、前記細胞は、一定圧力または可変圧力によって前記狭窄部に通される。一部の実施形態では、シリンジを使用して圧力を加える。一部の実施形態では、ポンプを使用して圧力を加える。一部の実施形態では、前記ポンプは蠕動運動ポンプまたはダイヤフラムポンプである。一部の実施形態では、真空を使用して圧力を加える。一部の実施形態では、前記細胞は重力によって前記狭窄部に通される。一部の実施形態では、前記細胞は遠心力によって前記狭窄部に通される。一部の実施形態では、前記細胞は毛管圧力によって前記狭窄部に通される。

30

【0138】

一部の実施形態では、流体流れは、前記細胞を、前記狭窄部を通るように方向付ける。一部の実施形態では、前記流体流れは、前記細胞が前記狭窄部を通過する前に乱流である。乱流は、所与の点における速度の大きさおよび方向が不規則に変動する流体流れである。一部の実施形態では、前記狭窄部を通る流体流れは、層流である。層流は、あらゆる点での流れの方向が一定のままである固体境界近くの流体の連続した流れを伴う。一部の実施形態では、前記流体流れは、前記細胞が前記狭窄部を通過した後に乱流である。前記細胞が前記狭窄部を通過する速度は可変であってよい。一部の実施形態では、前記細胞は、一様な細胞速度で前記狭窄部を通過する。一部の実施形態では、前記細胞は、変動する細胞速度で前記狭窄部を通過する。

40

【0139】

その他の実施形態では、細胞懸濁液を狭窄部に通す（ここで、抗原または寛容原性因子

50

が免疫細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす) ことによって、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するために組合せ処理が使用される、例えば、本明細書中に記載する方法の後に該狭窄部の下流の電場への曝露が続く。一部の実施形態では、前記細胞は、前記狭窄部を通過した後に少なくとも1つの電極によって生成された電場に通される。一部の実施形態では、前記電場は、細胞核などの前記細胞内の第2の位置への化合物の送達を助ける。例えば、細胞を変形させる狭窄部と電場との組合せは、抗体をコードするプラスミドを前記細胞(例えば、細胞核)に送達し、抗体の新たな産生を生じさせる。一部の実施形態では、1つまたは複数の電極が、前記細胞を変形させる狭窄部に近接して置かれて電場を生成する。一部の実施形態では、前記電場は、約0.1 kV/mから約100 MV/mまたはこれらの間の任意の数または数の範囲である。一部の実施形態では、電気信号を与えて電極を駆動するために集積回路が使用される。一部の実施形態では、前記細胞は、約1 nsから約1 sの間のパルス幅および約100 nsから約10 sの間の期間またはこれらの間の任意の時間もしくは時間の範囲で前記電場に曝露される。

10

【0140】

V I I I . 免疫細胞への送達用の細胞懸濁液

前記細胞懸濁液は、混合のまたは精製された細胞集団であってよい。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、全血などの混合の細胞集団である。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は、精製された免疫細胞集団などの精製された細胞集団である。

【0141】

前記細胞懸濁液の組成(例えば、容量オスモル濃度、塩濃度、血清含有量、細胞濃度、pHなど)は、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための前記化合物の送達に影響することがある。一部の実施形態では、懸濁液は全血を含む。あるいは、細胞懸濁液は、生理食塩水溶液中または血液以外の生理的媒体中の細胞の混合物である。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液は水溶液を含む。一部の実施形態では、前記水溶液は、細胞培養培地、PBS、塩、糖、成長因子、動物由来産物、増量剤(bulking material)、界面活性剤、潤滑剤、ビタミン、アミノ酸、タンパク質、細胞周期インヒビター、および/またはアクチン重合に影響を及ぼす剤を含む。一部の実施形態では、前記細胞培養培地は、DMEM、Opti-MEM(登録商標)、IMDM、またはRPMIである。さらに、緩衝溶液は、1つまたは複数の潤滑剤(プルロニックまたはその他の界面活性剤)を含んでもよく、これは、例えば、表面の詰まりを低減または除去し、かつ細胞生存率を向上させるように設計されたものであってよい。例示的な界面活性剤は、以下に限定されないが、ポロキサマー、ポリソルベート、糖または糖アルコール(マンニトール、ソルビトールなど)、動物由来血清、およびアルブミンタンパク質が挙げられる。

20

30

【0142】

ある特定の種類の細胞を伴う一部の構成では、該細胞は、該細胞内への前記化合物の送達を補助する1つまたは複数の溶液中でインキュベートされてもよい。一部の実施形態では、前記水溶液は、アクチン重合に影響を及ぼす剤を含む。一部の実施形態では、アクチン重合に影響を及ぼす剤は、ラトランクリンA、サイトカラシン、および/またはコルヒチンである。例えば、送達前に前記細胞をラトランクリンA(Lantrunculin A)(0.1 μg/ml)などの解重合溶液中で1時間インキュベートして、アクチン細胞骨格を解重合させることができる。追加の例として、送達前に前記細胞を10 μMコルヒチン(Sigima)中で2時間インキュベートして、微小管ネットワークを解重合させることができる。

40

【0143】

一部の実施形態では、前記細胞集団は、開示する方法において使用する前に富化される。例えば、細胞を体液(例えば、末梢血)から得、それを必要に応じて富化または精製してB細胞を濃縮する。細胞は、以下に限定されないが、磁気細胞分離、蛍光活性化細胞選別(FACS)、または密度勾配遠心分離などの当技術分野で公知の任意の方法によって富化することができる。

50

【0144】

前記細胞懸濁液の粘度もまた、本明細書に開示する方法に影響し得る。一部の実施形態では、前記細胞懸濁液の粘度は、約 $8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ から約 $4.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ またはこれらの間の任意の値または値の範囲に及ぶ。一部の実施形態では、前記粘度は、約 $8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ から約 $4.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の間、約 $8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ から約 $3.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の間、約 $8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ から約 $2.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の間、または約 $8.9 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ から約 $1.0 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ の間のいずれか1つに及ぶ。一部の実施形態では、前記粘度は、約 0.89 cP から約 4.0 cP の間、約 0.89 cP から約 3.0 cP の間、約 0.89 cP から約 2.0 cP の間、または約 0.89 cP から約 1.0 cP の間のいずれか1つに及ぶ。一部の実施形態では、ずり流動化効果が観察され、前記細胞懸濁液の粘度はせん断歪みの条件下で減少する。粘度は、以下に限定されないが、ガラスキャピラリー粘度計などの粘度計またはレオメーターなどの当技術分野で公知の任意の方法によって測定することができる。粘度計は1つの流れ状態下での粘度を測定するが、レオメーターは流れ状態が変化する粘度を測定するために使用される。一部の実施形態では、前記粘度は、血液などのずり流動化溶液について測定される。一部の実施形態では、前記粘度は、約 -5°C から約 45°C の間で測定される。例えば、前記粘度は、室温（例えば、約 20°C ）、生理的温度（例えば、約 37°C ）、生理的温度より高い温度（例えば、約 37°C より高い温度から 45°C またはさらに高い温度）、または低下させた温度（例えば、約 -5°C から約 4°C ）、あるいはこれらの例示的な温度の間の温度で測定される。

10

20

【0145】

IX. 免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための抗原および寛容原性因子

一部の実施形態では、本発明は、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための抗原の送達を提供し、ここで、該抗原は、本明細書に記載するいずれかの方法によって前記細胞に送達される。一部の実施形態では、前記抗原は単一の抗原である。一部の実施形態では、前記抗原は、抗原の混合物である。抗原は、細胞または抗体媒介性の免疫応答などの特異的な免疫応答を刺激する物質である。抗原は、特定の抗原に特異的な、T細胞受容体（TCR）などの免疫細胞によって発現された受容体に結合する。抗原と受容体の結合はその後、細胞内シグナル伝達経路を誘発し、それが細胞活性化、サイトカイン産生、細胞遊走、細胞毒性因子の分泌、および抗体産生などの下流の免疫エフェクター経路に繋がる。

30

【0146】

一部の実施形態では、前記抗原はポリペプチド抗原である。一部の実施形態では、前記化合物は、疾患に関連した抗原を含む。一部の実施形態では、前記抗原は、細菌、真菌、ウイルス、またはアレルゲンなどの外来の源に由来する。一部の実施形態では、前記抗原は、自己タンパク質（すなわち、自己抗原）などの内的な源に由来する。一部の実施形態では、前記抗原は細胞溶解物に存在する。自己抗原は、生物体の自身の細胞上または細胞中に存在する抗原である。自己抗原は、免疫応答を通常刺激しないが、I型糖尿病または関節リウマチなどの自己免疫疾患の状況では免疫応答を刺激することがある。一部の実施形態では、前記抗原は治療剤である。一部の実施形態では、前記抗原は、治療用ポリペプチドまたは治療用ポリペプチドの断片である。一部の実施形態では、前記治療剤は凝固因子である。例示的な凝固因子としては、以下に限定されないが、第VII因子および第IX因子が挙げられる。例えば、前記抗原は、血友病の処置に使用される第VII因子タンパク質であり得る。一部の実施形態では、前記治療剤は、抗体である。例示的な治療抗体には、限定されずに、抗TNF α 、抗VEGF、抗CD3、抗CD20、抗IL-2R、抗Her2、抗RSVF、抗CEA、抗IL-1ベータ、抗CD15、抗ミオシン、抗PSMA、抗40kDa糖タンパク質、抗CD33、抗CD52、抗IgE、抗CD11a、抗EGFR、抗C5、抗アルファ4インテグリン、抗IL-12/IL-23、抗IL-6Rおよび抗RANKLが含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は成長因子である。例示的な治療成長因子には、限定されずに、エリスロポイエチン（EPO）な

40

50

らびに巨核球の分化および成長因子（MDGF）が含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、ホルモンである。例示的な治療ホルモンには、限定されずに、インスリン、ヒト成長ホルモンおよび卵胞刺激ホルモンが含まれる。一部の実施形態では、前記治療剤は、組換えサイトカインである。例示的な治療組換えサイトカインには、限定されずに、IFN β 、IFN α およびGM-CSFが含まれる。

【0147】

一部の実施形態では、前記抗原は同種移植抗原である。同種移植は、同じ種の遺伝的に非同一のドナーからレシピエントへの細胞、組織、または器官の移入である。一部の実施形態では、前記抗原は修飾抗原である。例えば、抗原を治療剤またはターゲティングペプチドと融合することができる。一部の実施形態では、前記修飾抗原はポリペプチドと融合している。一部の実施形態では、前記修飾抗原は脂質と融合している。一部の実施形態では、前記抗原は、脂質、糖脂質、または多糖などの非タンパク質抗原である。一部の実施形態では、前記抗原は、インタクトな細菌などの微生物全体である。

10

【0148】

一部の実施形態では、前記抗原はウイルスに関連する。一部の実施形態では、前記抗原はウイルス抗原である。例示的なウイルス抗原としては、SARS-CoV抗原およびインフルエンザ抗原が挙げられる。一部の実施形態では、前記化合物は、未知の病原体に感染した組織からの細胞溶解物を含む。一部の実施形態では、前記抗原は治療ビヒクルである。一部の実施形態では、前記治療ビヒクルは、遺伝子療法のために使用されるアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、バキュロウイルス、ヘルペスウイルス、またはレトロウイルスなどのウイルスである。一部の実施形態では、前記治療ビヒクルはリポソームである。一部の実施形態では、治療ビヒクルはナノ粒子である。

20

【0149】

一部の実施形態では、前記抗原は微生物（例えば、細菌）に関連する。一部の実施形態では、前記抑制された免疫応答および／または誘導された寛容性は、減少した病原性免疫応答または前記微生物（例えば、細菌）への誘導された寛容性を含む。一部の実施形態では、前記微生物は、前記個体のマイクロバイオームの部分である。一部の実施形態では、前記微生物は、前記個体のマイクロバイオームに利益を与え得る。

【0150】

ある特定の態様では、本発明は、免疫細胞に抗原を送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含み、ここで、該細胞懸濁液が該抗原と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、寛容原性環境での前記抗原のプロセッシングおよび提示は、該抗原に対する免疫応答を抑制する。一部の実施形態では、寛容原性環境での前記抗原のプロセッシングおよび提示は、該抗原に対する寛容性を誘導する。一部の実施形態では、前記抗原は、*in vitro*で、*ex vivo*で、または*in vivo*で前記免疫細胞に送達される。

30

【0151】

一部の実施形態では、本発明は、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための寛容原性因子の送達を提供し、ここでは、該寛容原性因子が、本明細書に記載する任意の方法によって該細胞に送達される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗原に対する免疫応答の抑制を増強し、または抗原に対する寛容性の誘導を増強する。例えば、前記寛容原性因子は、抗原提示細胞による前記抗原の寛容原性の提示を促進し得る。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記抗原と同時に導入される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子および抗原は、逐次的に導入される。

40

【0152】

ある特定の態様では、本発明は、抗原を含む免疫抑制抗原提示免疫細胞を生成するための方法であって、該免疫抑制免疫細胞が狭窄部に通され、ここで、抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こし、それによって、該抗原を含む該免疫抑制免疫細胞が生成される、方法を提供する。

50

【0153】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫調節因子（例えば、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）、免疫抑制因子、または炎症性もしくは抗炎症性分子など）の発現および／または活性をモジュレートする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫賦活因子（例えば、共刺激分子）の発現および／または活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／または活性を増強し、炎症性分子の発現および／または活性を阻害し、かつ／または抗炎症性分子の発現および／または活性を増強する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の活性を阻害する。共刺激分子とそれらのリガンドとの間の相互作用は、TCRシグナル伝達を維持および統合して、最適なT細胞の増殖および分化を刺激するために重要である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の発現を減少させる。抗原提示細胞上で発現される例示的な共刺激分子としては、以下に限定されないが、CD40、CD80、CD86、CD54、CD83、CD79、またはICOSリガンドが挙げられる。一部の実施形態では、前記共刺激分子はCD80またはCD86である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子を発現するまたはその発現をモジュレートする核酸の発現を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子を発現するまたはその発現をモジュレートする核酸を欠失させる。一部の実施形態では、前記共刺激分子を発現するまたはその発現をモジュレートする前記核酸の欠失は、遺伝子編集を通じて達成される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は前記共刺激分子を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子を阻害するsiRNAである。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共刺激分子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共刺激分子のサプレッサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は前記共刺激分子を分解させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、破壊のために前記共刺激分子を標識する。例えば、寛容原性因子は、前記共刺激分子のユビキチン化を増強し、それによってそれを破壊の標的にし得る。

【0154】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫抑制分子の発現および／または活性を増強する。一部の実施形態では、前記免疫抑制分子は、共阻害分子、転写レギュレーター、または免疫抑制分子である。共阻害分子は、リンパ球の活性化を負に調節する。例示的な共阻害分子としては、以下に限定されないが、PD-L1、PD-L2、HVEM、B7-H3、TRAIL、免疫グロブリン様転写物（ILT）受容体（ILT2、ILT3、ILT4）、FasL、CTLA4、CD39、CD73、およびB7-H4が挙げられる。一部の実施形態では、前記共阻害分子はPD-L1またはPD-L2である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共阻害分子の発現を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は前記共阻害分子をコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子の発現を増加させるポリペプチドの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記共阻害分子のエンハンサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、共阻害分子のインヒビターを阻害する。

【0155】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫抑制分子の発現および／または活性を増加させる。例示的な免疫抑制分子としては、以下に限定されないが、アルギナーゼ1（ARG1）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、プロスタグランジンE2（PGE2）、誘導型一酸化窒素シンターゼ（iNOS）、一酸化窒素（NO）、一酸化窒素シンターゼ2（NOS2）、胸腺間質性リンパ球新生因子（TSLP）、血

管作動性腸管ペプチド（VIP）、肝細胞成長因子（HGF）、トランスフォーミング成長因子ベータ（TGF β ）、IFN α 、IL-4、IL-10、IL-13、およびIL-35が挙げられる。一部の実施形態では、前記免疫抑制分子はNOまたはIDOである。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子をコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子の発現を増強するポリペプチドの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記免疫抑制分子のエンハンサーをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、免疫抑制分子の負の調節因子を阻害する。

10

【0156】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、炎症性分子の発現および／または活性を阻害する。一部の実施形態では、前記炎症性分子は炎症性転写因子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は前記炎症性転写因子を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、炎症性転写因子の発現を減少させる。一部の実施形態では、前記炎症性転写因子は、NF- κ B、インターフェロン調節因子（IRF）、またはJAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子である。前記NF- κ B経路は、サイトカイン、ケモカイン、および接着分子などの炎症誘発性遺伝子の発現を媒介する原型的な炎症誘発性シグナル伝達経路である。インターフェロン調節因子（IRF）は、炎症誘発性遺伝子の発現を調節できる転写因子のファミリーを構成する。前記JAK-STATシグナル伝達経路は、細胞外サイトカインシグナルからの情報を核に伝達し、免疫細胞の増殖および分化に関与する遺伝子のDNA転写および発現を生じさせる。JAK-STAT系は、細胞表面受容体、ヤヌスキナーゼ（JAK）、およびシグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）タンパク質からなる。例示的なJAK-STAT分子としては、以下に限定されないが、JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5（STAT5AおよびSTAT5B）、およびSTAT6が挙げられる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー（SOCS）タンパク質の発現を増強する。SOCSタンパク質は、前記JAK-STAT経路を通じたシグナル伝達を阻害し得る。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子をコードする核酸の発現を阻害する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子をコードする核酸を欠失させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記炎症性転写因子のサプレッサーをコードする核酸を含む。

20

30

【0157】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗炎症性分子の発現および／または活性を増強する。一部の実施形態では、前記抗炎症性分子は抗炎症性転写因子である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は前記抗炎症性転写因子を増強する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗炎症性転写因子の発現を増加させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記抗炎症性転写因子をコードする核酸の発現を増強する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記抗炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を減少させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記抗炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を減少させる。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、前記抗炎症性転写因子のエンハンサーをコードする核酸を含む。

40

【0158】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は核酸を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は核酸である。例示的な核酸としては、以下に限定されないが、組換え核酸、DNA、組換えDNA、cDNA、ゲノムDNA、RNA、siRNA、mRNA、saR

50

NA、miRNA、lncRNA、tRNA、ガイドRNA、およびshRNAが挙げられる。一部の実施形態では、前記核酸は、前記細胞中の核酸と同種である。一部の実施形態では、前記核酸は、前記細胞中の核酸とは異種である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子はプラスミドである。一部の実施形態では、前記核酸は治療用核酸である。一部の実施形態では、前記核酸は治療用ポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、siRNA、mRNA、miRNA、lncRNA、tRNA、またはshRNAをコードする核酸を含む。例えば、寛容原性因子は、炎症性遺伝子の発現をノックダウンするためのsiRNAを含み得る。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、NFκBに結合し、NFκBの活性化および下流のシグナル伝達を防止するDNA配列である。

10

【0159】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子はポリペプチドを含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子はポリペプチドである。一部の実施形態では、前記タンパク質またはポリペプチドは、治療用タンパク質、抗体、融合タンパク質、抗原、合成タンパク質、レポーターマーカー、または選択マーカーである。一部の実施形態では、前記タンパク質は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、CREリコンビナーゼ、トランスポザーゼ、CAS9酵素、またはインテグラーゼ酵素などの遺伝子編集用タンパク質またはヌクレアーゼである。一部の実施形態では、前記融合タンパク質は、以下に限定されないが、抗体薬物コンジュゲートなどのキメラタンパク質薬物またはGSTもしくはストレプトアビジンでタグ化されたタンパク質などの組換え融合タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、前記化合物は転写因子である。例示的な転写因子としては、以下に限定されないが、Oct5、Sox2、c-Myc、Klf4、Tbet、GATA3、FoxP3、およびRORγtが挙げられる。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFNα、またはTGFβである。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは治療用ポリペプチドである。一部の実施形態では、前記ポリペプチドは治療用ポリペプチドの断片である。一部の実施形態では、前記ポリペプチドはペプチド核酸（PNA）である。

20

【0160】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子はタンパク質核酸複合体を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子はタンパク質核酸複合体である。一部の実施形態では、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）（CRISPR）-Cas9などのタンパク質核酸複合体は、ゲノム編集での応用において使用される。これらの複合体は、非特異的DNA切断ヌクレアーゼと組み合わせて配列特異的DNA結合ドメインを含有する。これらの複合体は、特定の遺伝子の配列の付加、破壊、または変更などの標的ゲノム編集を可能とする。一部の実施形態では、標的遺伝子の転写をブロックまたは誘導するために、無能力化されたCRISPRが使用される。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、Cas9タンパク質およびガイドRNAまたはドナーDNAを含有する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、Cas9タンパク質をコードする核酸およびガイドRNAまたはドナーDNAを含む。一部の実施形態では、前記遺伝子編集複合体は、共刺激分子（例えば、CD80および／またはCD86）の発現を標的にする。

30

40

【0161】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子はキメラ抗原受容体（CAR）を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子はキメラ抗原受容体（CAR）である。一部の実施形態では、前記CARは、細胞外認識ドメイン（例えば、抗原結合ドメイン）、膜貫通ドメイン、および1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインの融合物である。抗原が結合すると、CARの細胞内シグナル伝達部分は、免疫細胞内での免疫抑制または寛容原性に関連した応答を開始することができる。一部の実施形態では、前記CARはキメラT細胞抗

50

原受容体である。一部の実施形態では、前記CARの抗原結合ドメインは一本鎖抗体可変断片（scFv）である。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有する改変されたTCRをコードする。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有するキメラ抗原受容体をコードする。

【0162】

一部の実施形態では、前記寛容原性因子は小分子を含む。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は小分子である。一部の実施形態では、前記小分子は、共刺激分子の活性を阻害する、共阻害分子の活性を増強する、および／または炎症性分子の活性を阻害する。例示的な小分子としては、以下に限定されないが、医薬品、代謝物、および放射性核種または放射性核種含有分子が挙げられる。一部の実施形態では、前記医薬品は、治療薬および／または細胞毒性剤である。一部の実施形態では、前記化合物はナノ粒子を含む。ナノ粒子としては、例えば、金ナノ粒子、量子ドット、カーボンナノチューブ、ナノシェル、デンドリマー、およびリポソームが挙げられる。一部の実施形態では、前記ナノ粒子は、治療用分子を含有するまたは治療用分子に（共有結合的または非共有結合的に）連結されている。一部の実施形態では、前記ナノ粒子は、mRNAまたはcDNAなどの核酸を含有する。

10

【0163】

ある特定の態様では、本発明は、免疫細胞に寛容原性因子を送達するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入るように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップウィ含み、ここで、該細胞懸濁液は、該寛容原性因子と接触する、方法を提供する。一部の実施形態では、前記寛容原性因子は、*in vitro*で、*ex vivo*で、または*in vivo*で前記免疫細胞に送達される。

20

【0164】

一部の実施形態では、送達される前記化合物は精製されている。一部の実施形態では、前記化合物は、少なくとも約60重量%（乾燥重量）の目的の化合物である。一部の実施形態では、前記精製された化合物は、少なくとも約75%、90%、または99%の目的の化合物である。一部の実施形態では、前記精製された化合物は、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、98%、99%、または100%（w/w）の目的の化合物である。純度は、以下に限定されないが、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、HPLC分析、NMR、質量分析、またはSDS-PAGEなどの任意の公知の方法によって決定される。精製されたDNAまたはRNAは、外因性の核酸、炭水化物、および脂肪を含まないDNAまたはRNAとして定義される。

30

【0165】

一部の実施形態では、前記化合物は中間体化合物である。前記中間体化合物は、先行する中間体から形成され、さらに反応して最終反応生成物を与える分子の実体であり得る。一部の実施形態では、前記中間体化合物は、酵素によって切断されて、タンパク質の成熟した機能的形態を産生するタンパク質前駆体、またはプロタンパク質である。一部の実施形態では、前記中間体化合物は、活性酵素を産生するために修飾または切断を必要とする不活性の酵素前駆体、またはチモーゲンである。

40

【0166】

X. 応用

一部の態様では、本発明は、化合物が免疫細胞に入るように狭窄部に通すことによって改変された該免疫細胞を患者に導入することによって該患者を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、前記処置は、そのような改変された免疫細胞を前記患者に導入する複数回（2回、3回、4回、5回、6回、またはそれより多くの回数のいずれかなど）のステップを含む。一部の実施形態では、前記細胞は、患者から単離され、開示した方法にしたがって改変され、再び該患者に導入される。例えば、免疫細胞の集団が患者から単離

50

され、化合物の送達を達成するために前記狭窄部に通され、次いで治療的免疫応答を増大させるために該患者に再注入される。一部の実施形態では、前記細胞が個体から単離され、開示した方法にしたがって改変され、再び該個体に導入される。例えば、免疫細胞の集団が個体から単離され、化合物の送達を達成するために前記狭窄部に通され、次いで該個体において免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するために該患者に再注入される。

【0167】

一部の実施形態では、本発明は、化合物が細胞に入るように狭窄部に通すことによって改変された該細胞を個体に導入することによって該個体を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、前記細胞は自己の細胞である。例えば、前記免疫細胞が個体（例えば、患者）から単離され、開示した方法にしたがって改変され、再び該個体に導入される。一部の実施形態では、前記細胞が個体から単離され、開示した方法にしたがって改変され、再び同じ個体に導入される。一部の実施形態では、前記細胞は同種細胞である。例えば、前記細胞が異なる個体から単離され、開示した方法にしたがって改変され、第1の個体（例えば、患者）に導入される。一部の実施形態では、複数の個体からの細胞プールが開示した方法にしたがって改変され、第1の個体（例えば、患者）に導入される。一部の実施形態では、前記細胞が個体から単離され、開示した方法にしたがって改変され、異なる個体に導入される。一部の実施形態では、細胞の集団が個体（患者）または異なる個体から単離され、新たな抗体産生を誘導する化合物の送達を達成するために前記狭窄部に通され、次いで治療的応答を増大させるために患者に注入される。

【0168】

一部の実施形態では、前記処置は、本明細書中に記載する改変された免疫細胞を前記個体に投与する複数回（2回、3回、4回、5回、6回、またはそれより多くの回数のいずれかなど）のステップを含む。例えば、一部の実施形態では、化合物が細胞に入るように狭窄部に通すことによって改変された該細胞を個体に2回、3回、4回、5回、6回、またはそれより多くの回数投与することによって該個体を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、前記細胞の任意の2回の連続する投与の間の時間間隔は、少なくとも約1日（例えば、列挙する値の間の任意の範囲を含めて、少なくともおおよそ、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、またはより長い期間のいずれか）である。

【0169】

上記の方法のいずれについても、*in vitro*で、*ex vivo*で、または*in vivo*で実行される。*in vivo*での応用のために、デバイスを血管内腔に埋め込むことができ、例えば、インラインのステントが動脈または静脈に埋め込まれる。一部の実施形態では、本方法は、患者細胞の*ex vivo*処理および該患者への該細胞の即時の再導入のためのベッドサイドシステムの部分として使用される。そのような方法は、個体において免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導する手段として用いられ得る。一部の実施形態では、本方法は、ごくわずかに訓練された技師を有する典型的な病院の試験室で実行することができる。一部の実施形態では、患者操作処置システム（*patient operated treatment system*）が使用され得る。一部の実施形態では、本方法は、インラインの血液処理システムを使用して実行され、該システムでは、血液が患者から直接的に採取され、前記狭窄部に通されて血液細胞への化合物送達を生じ、そして処理後に該患者に再び直接的に輸血される。

【0170】

XI. システムおよびキット

一部の態様では、本発明は、前記狭窄部、細胞懸濁液、および本明細書中に開示する方法に使用するための化合物を含むシステムを提供する。前記システムは、上記に開示した方法について記載した任意の実施形態を含むことができ、該実施形態には、マイクロ流体チャネルまたは細胞を変形させる狭窄部を提供するための孔を有する表面、細胞懸濁液、細胞の摂動、送達のパラメーター、化合物、および／または応用などが含まれる。一部の

実施形態では、前記細胞を変形させる狭窄部は、免疫細胞への送達のためのサイズとなっている。一部の実施形態では、作動する流速、細胞および化合物濃度、前記狭窄部中での前記細胞の速度、および前記細胞懸濁液の組成（例えば、容量オスモル濃度、塩濃度、血清含有量、細胞濃度、pHなど）などの送達のパラメーターは、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための化合物の応答を最大にするために最適化される。

【0171】

免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための化合物の送達に使用するためのキットまたは物品も提供される。一部の実施形態では、前記キットは、好適な包装中に本明細書中に記載する組成物（例えば、マイクロ流体チャネルまたは孔を含有する表面、細胞懸濁液、および／または化合物）を含む。好適な包装材料は当技術分野で公知であり、例えば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、瓶、軟包装（例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋）などが挙げられる。これらの製品は、さらに滅菌および／または密封されていてもよい。

10

【0172】

本発明は、本明細書に記載の方法の構成部分を含むキットも提供し、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するために前記方法を実行するための指示（複数可）をさらに含んでもよい。本明細書に記載のキットは、その他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および包装挿入物などのその他の材料を、本明細書に記載の任意の方法を実行するための指示（例えば、免疫応答を抑制するまたは寛容性を誘導するための指示）と共にさらに含んでもよい。

20

XII. 例示的な実施形態

【0173】

実施形態1. 個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が寛容原性免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップと
- を含む方法。

【0174】

実施形態2. 個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、ステップと
- を含む方法。

30

【0175】

実施形態3. 個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
 - b. 該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該免疫細胞が寛容原性免疫細胞であり、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップと
- を含む方法。

40

【0176】

実施形態4. 個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、

- a. 免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原および寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該抗原を含む免疫抑制免疫細胞

50

を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、

b. 該免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法。

【0177】

実施形態5. 個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、抗原を含む寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

10

【0178】

実施形態6. 個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、抗原および寛容原性因子を含む寛容原性免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導するステップを含み、該寛容原性免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が寛容原性免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該寛容原性免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【0179】

実施形態7. 個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、該抗原を含む免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

20

【0180】

実施形態8. 個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、該抗原および寛容原性因子を含む免疫抑制免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制するステップを含み、該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体を狭窄部に通すことによって該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞に導入され、ここで、該抗原および該寛容原性因子が該免疫抑制免疫細胞またはその前駆体に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、方法。

30

【0181】

実施形態9. 寛容原性免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法。

【0182】

実施形態10. 免疫抑制免疫細胞を生成するための方法であって、免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって、該免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こすステップを含む、方法。

40

【0183】

実施形態11. 前記細胞と接触した寛容原性因子および抗原が前記免疫細胞に入るように、前記狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、実施形態9または10に記載の方法。

【0184】

実施形態12. 前記免疫細胞が第2の狭窄部にさらに通され、該細胞と接触した抗原が該

50

免疫細胞に入るように、該第2の狭窄部が該細胞を変形させ、それによって該細胞の摂動を引き起こす、実施形態9または10に記載の方法。

【0185】

実施形態13. 前記免疫細胞が抗原提示細胞である、実施形態9～12のいずれか1つに記載の方法。

【0186】

実施形態14. 抗原を含む寛容原性抗原提示細胞を生成する方法であって、寛容原性抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該細胞と接触した抗原が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【0187】

実施形態15. 抗原を含む免疫抑制抗原提示細胞を生成する方法であって、免疫抑制抗原提示細胞が狭窄部に通され、ここで、該細胞と接触した抗原が該抗原提示細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、方法。

【0188】

実施形態16. 寛容原性表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該寛容原性因子と接触させるステップであって、該寛容原性因子が免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、ステップとを含む方法。

【0189】

実施形態17. 寛容原性免疫細胞に抗原を送達するための方法であって、該寛容原性免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該寛容原性免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該抗原と接触させるステップとを含む方法。

【0190】

実施形態18. 免疫抑制表現型を生成する寛容原性因子を免疫細胞に送達するための方法であって、該免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該寛容原性因子が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該寛容原性因子と接触させるステップであって、該寛容原性因子が免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、ステップとを含む方法。

【0191】

実施形態19. 免疫抑制免疫細胞に抗原を送達するための方法であって、該免疫抑制免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該抗原が該細胞に入ることができるように、該狭窄部が該免疫抑制免疫細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、該細胞懸濁液を該抗原と接触させるステップとを含む方法。

【0192】

実施形態20. 個体において抗原への免疫応答を抑制するための方法であって、
a. 第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
b. 第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって免疫抑制免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
c. 該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗

10

20

30

40

50

原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法。

【0193】

実施形態21．前記第1または第2の免疫細胞による前記抗原の提示が、該抗原への免疫応答を抑制する、実施形態20に記載の方法。

【0194】

実施形態22．前記第2の免疫細胞が前記第1の免疫細胞に免疫抑制表現型を付与し、それによって免疫抑制性の第1の免疫細胞を生成し、該免疫抑制性の第1の免疫細胞による該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、実施形態20に記載の方法。

【0195】

実施形態23．個体において抗原への寛容性を誘導するための方法であって、
a．第1の免疫細胞を含む第1の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した抗原が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
b．第2の免疫細胞を含む第2の細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した寛容原性因子が該免疫細胞に入り、それによって寛容原性免疫細胞を生成するように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の摂動を引き起こす、ステップと、
c．該第1の免疫細胞および第2の免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該抗原の提示が該抗原への免疫応答を抑制する、ステップとを含む方法。

【0196】

実施形態24．前記第1または第2の免疫細胞による前記抗原の提示が、該抗原への寛容性を誘導する、実施形態23に記載の方法。

【0197】

実施形態25．前記第2の免疫細胞が前記第1の免疫細胞に寛容原性表現型を付与し、それによって寛容原性の第1の免疫細胞を生成し、該寛容原性の第1の免疫細胞による該抗原の提示が該抗原への寛容性を誘導する、実施形態23に記載の方法。

【0198】

実施形態26．前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞が、前記個体に同時に導入される、実施形態20～25のいずれか1つに記載の方法。

【0199】

実施形態27．前記第1の免疫細胞および前記第2の免疫細胞が、前記個体に逐次的に導入される、実施形態20～25のいずれか1つに記載の方法。

【0200】

実施形態28．前記寛容原性免疫細胞またはその前駆体が、アジュバントと接触していない、実施形態1、2、5、6、9、11～14、16、17および23～27のいずれか1つに記載の方法。

【0201】

実施形態29．前記免疫抑制免疫細胞またはその前駆体が、アジュバントと接触していない、実施形態3、4、7、8、10～13、15、18～22、26および27のいずれか1つに記載の方法。

【0202】

実施形態30．前記アジュバントが、TLR3およびRLRリガンド、TLR4リガンド、TLR5リガンド、TLR7／8リガンド、TLR9リガンド、NOD2リガンド、ミョウバン、油中水型エマルジョン、rhIL-2、抗CD40、CD40L、IL-12ならびに環状ジヌクレオチドからなる群から選択される、実施形態28または29に記載の方法。

【0203】

実施形態31．前記寛容原性免疫細胞が、該寛容原性免疫細胞の非寛容原性前駆体と比較して1つまたは複数の共刺激シグナルを提供する低減された能力を含む、実施形態1、2、5、6、9、11～14、16、17および23～28のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0204】

実施形態32. 前記免疫抑制免疫細胞が、該免疫抑制免疫細胞の非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の共刺激シグナルを提供する低減された能力を含む、実施形態3、4、7、8、10～13、15、18～22、26、27および29のいずれか1つに記載の方法。

【0205】

実施形態33. 前記1つまたは複数の共刺激シグナルが、CD40、CD80、CD86、CD54、CD83、CD79およびICOSリガンドからなる群から選択される分子によって媒介される、実施形態31または32に記載の方法。

【0206】

実施形態34. 前記寛容原性免疫細胞が、該寛容原性免疫細胞の非寛容原性前駆体と比較して1つまたは複数の炎症性シグナルを提供する低減された能力を含む、実施形態1、2、5、6、9、11～14、16、17、23～28および31のいずれか1つに記載の方法。

【0207】

実施形態35. 前記免疫抑制免疫細胞が、該免疫抑制免疫細胞の非免疫抑制前駆体と比較して1つまたは複数の炎症性シグナルを提供する低減された能力を含む、実施形態3、4、7、8、10～13、15、18～22、26、27、29および32のいずれか1つに記載の方法。

【0208】

実施形態36. 前記1つまたは複数の炎症性シグナルが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN-γ)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、NF-κB、インターフェロン調節因子 (IRF)、およびJAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子からなる群から選択される分子によって媒介される、実施形態34または35に記載の方法。

【0209】

実施形態37. 前記寛容原性因子が、免疫賦活因子の発現および／もしくは活性を阻害し、免疫抑制分子の発現および／もしくは活性を増強し、炎症性分子の発現および／もしくは活性を阻害し、ならびに／または抗炎症分子の発現および／もしくは活性を増強する、実施形態2、4、6、8～11、16、18、20および23のいずれか1つに記載の方法。

【0210】

実施形態38. 前記抗原が、前記寛容原性免疫細胞によって提示される、実施形態1、2、5、6、11～14、17、23～28および31のいずれか1つに記載の方法。

【0211】

実施形態39. 前記抗原が、前記免疫抑制免疫細胞によって提示される、実施形態3、4、7、8、11～13、15、19～22、26、27、29および32のいずれか1つに記載の方法。

【0212】

実施形態40. 少なくとも1つの他の抗原への寛容性が誘導される、実施形態2、6、9、11～13、16、23～28および31のいずれか1つに記載の方法。

【0213】

実施形態41. 少なくとも1つの他の抗原への免疫応答が抑制される、実施形態4、8、10～13、18、20～22、26、27、29および32のいずれか1つに記載の方法。

【0214】

実施形態42. 少なくとも1つのさらなる抗原が、前記細胞に導入される、実施形態1～8、11、12、14、15、17、19および20～25のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0215】

実施形態43．少なくとも1つのさらなる寛容原性因子が、前記細胞に導入される、実施形態2、4、6、8、9～11、16、18、20および23のいずれか1つに記載の方法。

【0216】

実施形態44．個体において免疫応答を抑制するための方法であって、

a．免疫細胞を含む細胞懸濁液を狭窄部に通すステップであって、該細胞と接触した非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物が該免疫細胞に入るように、該狭窄部が該細胞を変形させ、該細胞の損傷を引き起こす、ステップと、

b．該免疫細胞を該個体に導入するステップであって、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が発現され、該非機能的サイトカイン結合タンパク質が遊離炎症性サイトカインを結合する、ステップと

を含む方法。

【0217】

実施形態45．前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、非機能的サイトカイン受容体を含む、実施形態44に記載の方法。

【0218】

実施形態46．前記非機能的サイトカイン受容体が、細胞質シグナル伝達ドメインを欠いている、実施形態45に記載の方法。

【0219】

実施形態47．前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、標的サイトカインを切断するタンパク分解部位を含む、実施形態44に記載の方法。

【0220】

実施形態48．前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、抗サイトカイン抗体を含む、実施形態44に記載の方法。

【0221】

実施形態49．前記非機能的サイトカイン結合タンパク質が、抗サイトカインB細胞受容体を含む、実施形態44に記載の方法。

【0222】

実施形態50．前記免疫細胞が、前記個体に由来する、実施形態1～7および20～44のいずれか1つに記載の方法。

【0223】

実施形態51．前記免疫細胞が、異なる個体に由来する、実施形態1～7および20～44のいずれか1つに記載の方法。

【0224】

実施形態52．前記狭窄部が、マイクロ流体チャネルの中に含有される、実施形態1～51のいずれか1つに記載の方法。

【0225】

実施形態53．前記狭窄部が孔であるか、または孔の中に含有される、実施形態1～51のいずれか1つに記載の方法。

【0226】

実施形態54．前記孔が、表面に含有される、実施形態53に記載の方法。

【0227】

実施形態55．前記表面が、フィルターである、実施形態54に記載の方法。

【0228】

実施形態56．前記表面が、膜である、実施形態54に記載の方法。

【0229】

実施形態57．前記狭窄部サイズが、前記免疫細胞の直径の関数である、実施形態1～56のいずれか1つに記載の方法。

【0230】

10

20

30

40

50

実施形態 58. 前記狭窄部サイズが、前記細胞直径の約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% または約 99% である、実施形態 1～57 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0231】

実施形態 59. 前記チャネルが、約 10 μm の狭窄部長および約 4 μm の狭窄部幅を含む、実施形態 1～58 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0232】

実施形態 60. 前記孔径が、約 0.4 μm 、約 3 μm 、約 4 μm 、約 5 μm 、約 8 μm 、約 10 μm 、約 12 μm または約 14 μm である、実施形態 1～59 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0233】

実施形態 61. 約 -5°C ～約 45°C の間で実行される、実施形態 1～60 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0234】

実施形態 62. 前記細胞懸濁液が、混合細胞集団を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0235】

実施形態 63. 前記細胞懸濁液が、全血である、実施形態 62 に記載の方法。

【0236】

実施形態 64. 前記細胞懸濁液が、末梢血単核細胞を含む、実施形態 62 に記載の方法。

20

【0237】

実施形態 65. 前記細胞懸濁液が、精製された細胞集団を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0238】

実施形態 66. 前記細胞懸濁液が、哺乳動物細胞を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0239】

実施形態 67. 前記細胞懸濁液が、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～66 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0240】

実施形態 68. 前記細胞懸濁液が、ヒト細胞を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～66 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0241】

実施形態 69. 前記細胞懸濁液が、非哺乳動物細胞を含む、実施形態 1～4、9、10 および 16～65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0242】

実施形態 70. 前記細胞懸濁液が、細菌細胞、酵母細胞、ニワトリ細胞、カエル細胞、昆虫細胞、魚類細胞または線虫細胞を含む、実施形態 1～4、9、10、16～65 および 69 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0243】

実施形態 71. 前記免疫細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 1～13 および 16～68 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0244】

実施形態 72. 前記免疫細胞が、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞である、実施形態 1～13、16～68 および 71 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0245】

実施形態 73. 前記免疫細胞が、ヒト細胞である、実施形態 1～13、16～68 および 71 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【0246】

実施形態74. 前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髄由来サプレッサー細胞または肥満細胞である、実施形態1～13および16～73のいずれか1つに記載の方法。

【0247】

実施形態75. 前記抗原提示細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態14、15および50～74のいずれか1つに記載の方法。

【0248】

実施形態76. 前記抗原提示細胞が、サル細胞、マウス細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ウマ細胞、ラット細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞またはウサギ細胞である、実施形態14、15および50～75のいずれか1つに記載の方法。

10

【0249】

実施形態77. 前記抗原提示細胞が、ヒト細胞である、実施形態14、15および50～75のいずれか1つに記載の方法。

【0250】

実施形態78. 前記抗原提示細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、自然リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、骨髄由来サプレッサー細胞または肥満細胞である、実施形態14、15および50～77のいずれか1つに記載の方法。

【0251】

実施形態79. 前記抗原が、外来抗原である、実施形態1～15、20～43および50～78のいずれか1つに記載の方法。

20

【0252】

実施形態80. 前記抗原が、自己抗原である、実施形態1～15、20～43および50～78のいずれか1つに記載の方法。

【0253】

実施形態81. 前記抗原が、同種移植抗原である、実施形態1～15、20～43および50～78のいずれか1つに記載の方法。

【0254】

実施形態82. 前記抗原が、タンパク質またはポリペプチドである、実施形態1～15、20～43および50～78のいずれか1つに記載の方法。

30

【0255】

実施形態83. 前記抗原が、溶解物である、実施形態1～15、20～43および50～78のいずれか1つに記載の方法。

【0256】

実施形態84. 前記抗原が、修飾抗原である、実施形態1～15、20～43および50～83のいずれか1つに記載の方法。

【0257】

実施形態85. 前記修飾抗原が、治療剤と融合した抗原を含む、実施形態84に記載の方法。

【0258】

実施形態86. 前記修飾抗原が、ターゲティングペプチドと融合した抗原を含む、実施形態84に記載の方法。

40

【0259】

実施形態87. 前記細胞懸濁液が、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後に前記抗原と接触する、実施形態1～4、9、10および16～86のいずれか1つに記載の方法。

【0260】

実施形態88. 前記寛容原性因子が、共刺激分子の活性を阻害する、実施形態1～43および50～87のいずれか1つに記載の方法。

【0261】

50

実施形態 89. 前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を低下させる、実施形態 1～43 および 50～88 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0262】

実施形態 90. 前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現をモジュレートする核酸を欠失させる、実施形態 1～43 および 50～89 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0263】

実施形態 91. 前記寛容原性因子が、共刺激分子を阻害する、実施形態 1～43 および 50～88 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0264】

実施形態 92. 前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる、実施形態 1～43 および 50～91 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0265】

実施形態 93. 前記寛容原性因子が、共刺激分子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる、実施形態 1～43 および 50～91 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0266】

実施形態 94. 前記寛容原性因子が、前記共刺激分子のサプレッサーをコードする核酸を含む、実施形態 1～43 および 50～88 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0267】

実施形態 95. 前記共刺激分子が、CD80 または CD86 である、実施形態 88～94 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0268】

実施形態 96. 前記寛容原性因子が、免疫抑制因子の活性を増強する、実施形態 1～43 および 50～95 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0269】

実施形態 97. 前記免疫抑制因子が、共阻害分子、転写レギュレーターまたは免疫抑制分子である、実施形態 96 に記載の方法。

【0270】

実施形態 98. 前記寛容原性因子が、共阻害分子の活性を増強する、実施形態 1～43、50～87、96 および 97 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【0271】

実施形態 99. 前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増加させる、実施形態 1～43、50～87 および 96～98 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0272】

実施形態 100. 前記寛容原性因子が、共阻害分子をコードする、実施形態 1～43、50～87 および 96～99 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0273】

実施形態 101. 前記寛容原性因子が、共阻害分子の活性を増加させる、実施形態 1～43、50～87 および 96～100 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0274】

実施形態 102. 前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる、実施形態 1～43、50～87 および 96～98 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0275】

実施形態 103. 前記寛容原性因子が、共阻害分子の発現を増加させるポリペプチドの活性を増加させる、実施形態 1～43、50～87、96～98 および 102 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0276】

実施形態 104. 前記寛容原性因子が、共阻害分子のエンハンサーをコードする核酸を含む、実施形態 1～43、50～87、96～98 および 102 のいずれか 1 つに記載の方

50

法。

【0277】

実施形態105. 前記共阻害分子が、PD-L1、PD-L2またはCTLA-4である、実施形態97～104のいずれか1つに記載の方法。

【0278】

実施形態106. 前記寛容原性因子が、前記免疫抑制分子の活性を増強する、実施形態1～43、50～87、96および97のいずれか1つに記載の方法。

【0279】

実施形態107. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増加させる、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

10

【0280】

実施形態108. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子をコードする、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

【0281】

実施形態109. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の活性を増加させる、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

【0282】

実施形態110. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増強する転写レギュレーターの活性を増加させる、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

20

【0283】

実施形態111. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子の発現を増強するポリペプチドの活性を増加させる、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

【0284】

実施形態112. 前記寛容原性因子が、免疫抑制分子のエンハンサーをコードする核酸を含む、実施形態1～43、50～87、96、97および106のいずれか1つに記載の方法。

【0285】

実施形態113. 前記免疫抑制分子が、ARG1、NO、NOS2、IDO、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN α またはTGF β である、実施形態97および106のいずれか1つに記載の方法。

30

【0286】

実施形態114. 前記寛容原性因子が、炎症性分子の活性を阻害する、実施形態1～43および50～87のいずれか1つに記載の方法。

【0287】

実施形態115. 前記炎症性分子が、炎症性転写因子である、実施形態114に記載の方法。

【0288】

実施形態116. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子を阻害する、実施形態1～43、50～87、114および115のいずれか1つに記載の方法。

40

【0289】

実施形態117. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を低下させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0290】

実施形態118. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子をコードする核酸を欠失させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0291】

実施形態119. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を抑制する転写レギュレーターの活性を増加させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれ

50

か1つに記載の方法。

【0292】

実施形態120. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子の発現を抑制するタンパク質インヒビターの活性を増加させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0293】

実施形態121. 前記寛容原性因子が、炎症性転写因子のサプレッサーをコードする核酸を含む、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0294】

実施形態122. 前記炎症性転写因子が、NF- κ B、インターフェロン調節因子、または前記JAK-STATシグナル伝達経路に関連した分子である、実施形態115～121のいずれか1つに記載の方法。

【0295】

実施形態123. 前記寛容原性因子が、1つまたは複数の炎症性サイトカインの産生および/または分泌を減少させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0296】

実施形態124. 前記1つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12およびIL-18、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロンガンマ(IFN- γ)、ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)からなる群から選択される、実施形態123に記載の方法。

【0297】

実施形態125. 前記寛容原性因子が、1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの産生および/または分泌を増加させる、実施形態1～43、50～87および114～116のいずれか1つに記載の方法。

【0298】

実施形態126. 前記1つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN- α およびトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF β)からなる群から選択される、実施形態125に記載の方法。

【0299】

実施形態127. 前記寛容原性因子が、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有する改変されたTCRをコードする、実施形態1～43および50～87のいずれか1つに記載の方法。

【0300】

実施形態128. 前記寛容原性因子が、抗原に結合すると免疫抑制サイトカインの産生を誘発する細胞質シグナル伝達ドメインを含有するキメラ抗原受容体をコードする、実施形態1～43および50～87のいずれか1つに記載の方法。

【0301】

実施形態129. 前記寛容原性因子が、核酸を含む、実施形態1～43および50～128のいずれか1つに記載の方法。

【0302】

実施形態130. 前記寛容原性因子が、siRNA、mRNA、miRNA、lncRNA、tRNAまたはshRNAをコードする核酸を含む、実施形態1～43および50～129のいずれか1つに記載の方法。

【0303】

実施形態131. 前記寛容原性因子が、プラスミドである、実施形態1～43および50～130のいずれか1つに記載の方法。

【0304】

実施形態132. 前記寛容原性因子が、タンパク質核酸複合体を含む、実施形態1～43

10

20

30

40

50

および50～128のいずれか1つに記載の方法。

【0305】

実施形態133．前記寛容原性因子が、Cas9ポリペプチドおよびガイドRNAまたはドナーDNAを含む、実施形態1～43、50～128および132のいずれか1つに記載の方法。

【0306】

実施形態134．前記寛容原性因子が、Cas9ポリペプチドおよびガイドRNAまたはドナーDNAをコードする核酸を含む、実施形態1～43および50～129のいずれか1つに記載の方法。

【0307】

実施形態135．前記寛容原性因子が、ポリペプチドを含む、実施形態1～43および50～128のいずれか1つに記載の方法。

【0308】

実施形態136．前記ポリペプチドが、ヌクレアーゼ、TALENタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼまたはCREリコンビナーゼである、実施形態1～43、50～128および135のいずれか1つに記載の方法。

【0309】

実施形態137．前記ポリペプチドが、トランスポザーゼまたはインテグラーゼ酵素である、実施形態1～43、50～128および135のいずれか1つに記載の方法。

【0310】

実施形態138．前記ポリペプチドが、抗体である、実施形態1～43、50～128および135のいずれか1つに記載の方法。

【0311】

実施形態139．前記ポリペプチドが、転写因子である、実施形態1～43、50～128および135のいずれか1つに記載の方法。

【0312】

実施形態140．前記寛容原性因子が、小分子である、実施形態1～43および50～128のいずれか1つに記載の方法。

【0313】

実施形態141．前記寛容原性因子が、ナノ粒子である、実施形態1～43および50～128のいずれか1つに記載の方法。

【0314】

実施形態142．前記細胞懸濁液が、前記狭窄部を通る前に、それと同時にまたはその後に前記寛容原性因子と接触する、実施形態1～43および50～141のいずれか1つに記載の方法。

【0315】

実施形態143．前記免疫応答が、少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約90%または約100%抑制される、実施形態3、4、7、8および10～142のいずれか1つに記載の方法。

【0316】

実施形態144．前記抑制された免疫応答が、1つまたは複数の炎症性サイトカインの減少した産生および／または分泌を含む、実施形態3、4、7、8および10～143のいずれか1つに記載の方法。

【0317】

実施形態145．前記1つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12およびIL-18、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロンガンマ(IFN-ガンマ)ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)からなる群から選択される、実施形態144に記載の方法。

【0318】

10

20

30

40

50

実施形態 146. 前記抑制された免疫応答が、1つまたは複数の抗炎症性サイトカインの増加した産生および／または分泌を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～143 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0319】

実施形態 147. 前記 1つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN- α およびトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF β) からなる群から選択される、実施形態 146 に記載の方法。

【0320】

実施形態 148. 前記抑制された免疫応答が、T細胞応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～143 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0321】

実施形態 149. 前記 T細胞応答の減少が、T細胞活性化の減少を含む、実施形態 148 に記載の方法。

【0322】

実施形態 150. 前記 T細胞応答の減少が、T細胞生存の減少を含む、実施形態 148～149 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0323】

実施形態 151. 前記 T細胞応答の減少が、T細胞増殖の減少を含む、実施形態 148～150 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0324】

実施形態 152. 前記 T細胞応答の減少が、T細胞機能性の減少を含む、実施形態 148～151 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0325】

実施形態 153. 前記抑制された免疫応答が、Treg 応答の増強を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～152 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0326】

実施形態 154. 前記抑制された免疫応答が、B細胞応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～153 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0327】

実施形態 155. 前記 B細胞応答の減少が、抗体産生の減少を含む、実施形態 154 に記載の方法。

30

【0328】

実施形態 156. 前記抑制された免疫応答が、サイトカイン産生の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～155 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0329】

実施形態 157. 前記抑制された免疫応答が、自己免疫応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～156 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0330】

実施形態 158. 前記抑制された免疫応答が、アレルギー応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～157 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0331】

実施形態 159. 前記抗原が、移植組織に関連した抗原である、実施形態 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0332】

実施形態 160. 前記抑制された免疫応答が、前記移植組織に対する免疫応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～159 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0333】

実施形態 161. 前記抗原が、ウイルスに関連する、実施形態 1～15、20～43 および 50～78 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0334】

50

実施形態 162. 前記抑制された免疫応答が、前記ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～161 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0335】

実施形態 163. 前記抑制された免疫応答が、治療剤に対する免疫応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～162 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0336】

実施形態 164. 前記抑制された免疫応答が、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む、実施形態 3、4、7、8 および 10～163 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0337】

実施形態 165. 前記寛容性が、1 つまたは複数の炎症性サイトカインの産生および／または分泌の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43 および 50～142 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0338】

実施形態 166. 前記 1 つまたは複数の炎症性サイトカインが、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-12 および IL-18、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロンガンマ (IFN-γ) ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) からなる群から選択される、実施形態 165 に記載の方法。

【0339】

実施形態 167. 前記寛容性が、1 つまたは複数の抗炎症性サイトカインの産生および／または分泌の増加を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43 および 50～142 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0340】

実施形態 168. 前記 1 つまたは複数の抗炎症性サイトカインが、IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IFN-α およびトランスフォーミング成長因子ベータ (TGFβ) からなる群から選択される、実施形態 167 に記載の方法。

【0341】

実施形態 169. 前記寛容性が、T 細胞応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43 および 50～142 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0342】

実施形態 170. 前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞活性化の減少を含む、実施形態 169 に記載の方法。

30

【0343】

実施形態 171. 前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞生存の減少を含む、実施形態 169～170 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0344】

実施形態 172. 前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞増殖の減少を含む、実施形態 169～171 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0345】

実施形態 173. 前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞機能性の減少を含む、実施形態 169～172 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0346】

実施形態 174. 前記 T 細胞応答の減少が、T 細胞表現型の変化を含む、実施形態 169～173 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0347】

実施形態 175. 前記寛容性が、T 細胞の非共刺激活性化を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～174 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0348】

実施形態 176. 前記寛容性が、Treg 応答の増強を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～175 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0349】

50

実施形態 177. 前記寛容性が、B細胞応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～176 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0350】

実施形態 178. 前記 B細胞応答の減少が、抗体産生の減少を含む、実施形態 177 に記載の方法。

【0351】

実施形態 179. 前記寛容性が、サイトカイン産生の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～178 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0352】

実施形態 180. 前記寛容性が、自己免疫応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～179 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

【0353】

実施形態 181. 前記寛容性が、アレルギー応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～180 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0354】

実施形態 182. 前記寛容性が、前記移植組織に対する免疫応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～181 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0355】

実施形態 183. 前記寛容性が、前記ウイルスへの病原性免疫応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～182 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【0356】

実施形態 184. 前記寛容性が、治療剤に対する免疫応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～183 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0357】

実施形態 185. 前記寛容性が、治療ビヒクルに対する免疫応答の減少を含む、実施形態 1、2、5、6、23～43、50～142 および 169～184 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【0358】

実施形態 186. 少なくとも 1、2、3、4、5 または 6 回繰り返される、実施形態 1～185 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0359】

実施形態 187. 前記方法の任意の 2 回の繰り返しの間の時間間隔が、少なくとも 1 日、1 週、1 カ月、2 カ月、3 カ月、4 カ月、5 カ月、6 カ月または 1 年である、実施形態 186 に記載の方法。

【0360】

実施形態 188. 実施形態 1～43 および 50～187 のいずれか 1 つに記載の方法で使用するための、前記狭窄部、免疫細胞、抗原および／または寛容原性因子を含む系。 40

【0361】

実施形態 189. 実施形態 44～187 のいずれか 1 つに記載の方法で使用するための、前記狭窄部、免疫細胞および非機能的サイトカイン結合タンパク質をコードする化合物を含む系。

【実施例】

【0362】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を例に挙げて説明する目的で与えるものであり、どのような形でも本開示を限定することを意図するものではない。当業者であれば、本開示が目的 (object) を実行し、記載した結果および利点を得るため、ならびに本明細書に固有の目的、結果、および利点に十分に適合していることを容易に理解するであろう 50

。請求項の範囲によって規定される本開示の精神の範囲内に包含されるその変更およびその他の使用を当業者は想起するであろう。

【0363】

(実施例1)

寛容性を誘導するためのB細胞への抗原および寛容原性因子の狭窄媒介性の送達

モデル抗原およびトランスジェニックT細胞を使用して、寛容性の誘導を実証するための一連の実験に着手する。

【0364】

B細胞を寛容原性因子およびOVA抗原+/-寛容原性因子と混合し、マイクロ流体チャンネルの中の前記狭窄部、または孔を含有する表面に通す(そのような狭窄媒介性の送達もSQZと称する)。送達を達成するために圧力、温度、および緩衝液組成を最適化する。CFSE標識されたOT-IまたはOT-II T細胞をCD45.1マウスに移入した後、OVAおよび寛容原性因子保有B細胞を移入する。その後、OVA+LPSの皮内注射によってマウスをチャレンジする。流入領域膝窩リンパ節を回収し、OT-IまたはOT-II T細胞の増殖(expansion)を測定する。

【0365】

(実施例2)

寛容性を誘導するためのB細胞への抗原の狭窄媒介性の送達

本研究では、抗原の狭窄媒介性の送達によって生成された細胞内抗原を含有するB細胞抗原提示細胞(APC)の、*in vivo*で抗原依存的寛容性を誘導する能力を評価した。マウスに抗原特異的T細胞を接種し、B細胞APCの注射により寛容化し、抗原特異的T細胞の数および炎症性サイトカインIFN- γ のレベルを決定した。

【0366】

材料および方法

0日目に雌ドナーマウスからC57BL/6Jレシピエントマウス(CD45.1+)にマウス毎にOVA特異的CD8⁺ OT-I細胞(1×10^6)およびCD4⁺ OT-II T細胞(1×10^6)(共にCD45.2+)を養子移入した。1日目にC57BL/6JマウスからB細胞を回収し、狭窄なし(without constriction)(B細胞-Endo)またはOVAタンパク質の狭窄媒介性細胞内送達(B細胞-SQZ)ありのいずれかで全長OVAタンパク質と共にインキュベートした。次いで、 5×10^6 個の各々のB細胞/マウスをレシピエントマウスに注射した。対照動物にPBS(チャレンジ対照)または10 μ gの遊離OVA(寛容性対照)のいずれかの注射を与えた。8日目に10 μ gのOVAタンパク質+50 ngのLPS/マウスの皮内注射で抗原チャレンジを行った。12日目に各マウスの流入リンパ節および脾臓を分析し、抗原チャレンジに対するOT-IおよびOT-II T細胞応答をOT-IおよびOT-II T細胞数、IFN- γ 細胞内染色についてのフローサイトメトリー、およびELISpotアッセイによって測定した。処置スケジュールの図解を図1に示し、処置群を表1に要約する。

10

20

30

【表 1】

表 1

群	0 日目	1 日目	8 日目
チャレンジ対照	OT-I および OT-II の養子移入	PBS	OVA + LPS
寛容性対照	OT-I および OT-II の養子移入	OVA タンパク質	OVA + LPS
B 細胞-Endo	OT-I および OT-II の養子移入	狭窄なしで OVA と インキュベートした B 細胞	OVA + LPS
B 細胞-SQZ	OT-I および OT-II の養子移入	狭窄によって送達さ れた OVA を有する B 細胞	OVA + LPS

10

20

【0367】

結果

12 日目に 4 つの処置群のマウスにおいて OT-I 特異的 T 細胞および OT-II 特異的 T 細胞の数を測定した。流入リンパ節由来の細胞 (CD3⁺/CD8⁺でゲートまたは CD3⁺/CD4⁺でゲート) および脾臓由来の細胞 (CD3⁺/CD8⁺でゲート) を抗原提示細胞のマーカーとして T 細胞受容体 (TCR) Vα2 (TCRVα2) およびドナー T 細胞のマーカーとして CD45.2 を染色してフローサイトメトリーにより分析した。CD8⁺ OT-I T 細胞 (TCRVα2⁺/CD45.2⁺) のパーセンテージの減少によって示されるように、チャレンジ対照と比べて、OVA タンパク質の狭窄媒介性の送達を有する B 細胞でプライミングしたマウスにおいて、流入リンパ節および脾臓の両方で OT-I T 細胞の活性化および増殖が有意に阻害された (* P<0.05) (図 2 左および中央パネル)。狭窄なしで OVA とインキュベートした B 細胞でプライミングしたマウスと比べて B 細胞-SQZ 動物では CD8⁺ OT-I T 細胞のレベルが減少していたため (** P<0.01)、この効果は狭窄媒介性細胞内抗原送達に依存した。CD4⁺ OT-II 細胞 (TCRVα2⁺/CD45.2⁺) のパーセンテージも、チャレンジ対照と比べて B 細胞-SQZ 動物のリンパ節で有意に阻害された (図 2 右パネル; * P<0.05)。処置群間で脾臓 OT-II レベルに有意差はなかったが (データ示さず)、B 細胞-SQZ 動物はチャレンジ後に B 細胞-Endo と比べて OT-II のパーセンテージのわずかな減少を示し、有意性に向かう傾向が見られた。

30

【0368】

T 細胞機能に対する B 細胞 SQZ 媒介性の寛容性の機能的効果を評価するために、SIFNFKL ペプチド (配列番号 1) (CD8⁺ 活性 OVA エピトープ) で再刺激した OT-I T 細胞のうちの高レベルの IFN-γ を発現する脾臓 T 細胞のパーセント (図 3 左) および細胞あたりの IFN-γ 産生レベル (図 3 右; TCRVα2⁺/CD45.2⁺/CD44^{hi} 細胞に基づく MFI) を細胞内サイトカインの染色によって全ての群について評価した。B 細胞-SQZ マウスの OT-I T 細胞は、IFN-γ 高発現細胞のパーセンテージおよび IFN-γ 産生の両方において、チャレンジ対照と比べて (***) P<0.0005) ならびに B 細胞-Endo 処置マウスと比べて (***) P<0.0005、**** P<0.0001)、減少を示した。興味深いことに、B 細胞-SQZ マウスは、寛容性対照と比べても高 IFN-γ 細胞のパーセンテージにおいて有意な減少を

40

50

示した（* $P < 0.05$ ）。IFN- γ 産生 OT-I T 細胞の数を ELISpot によってさらに確認した（図 4）。フローサイトメトリーデータと相関して、B 細胞-SQZ 動物は、チャレンジ対照（** $P < 0.01$ ）および B 細胞-Endo（**** $P < 0.0001$ ）と比べて有意に少ない数の IFN- γ 陽性 T 細胞を産生した。

【0369】

各処置群についての TCRVa2+脾臓 OT-I T 細胞およびリンパ節 OT-I I T 細胞の代表的なフローサイトグラムは、B 細胞-SQZ マウスはチャレンジ対照および B 細胞-Endo と比べてより少数の OT-I および OT-I I を有することを示す（図 5、表 2）。高い IFN- γ および CD44 抗原活性化マーカーを有する OT-I 細胞の代表的な IC5 フローサイトグラムは、B 細胞-SQZ 試料はチャレンジ対照および B 細胞-Endo と比べてより少数の IFN- γ -high T 細胞を有したことを示す（図 6、表 3）。

【表 2】

表 2

	CD3+/CD8+細胞のうちの OT-I 細胞のパーセント			
	チャレンジ対照	寛容性対照	B 細胞-Endo	B 細胞-SQZ
脾臓	1.47	0.79	1.54	0.32
リンパ節	0.77	0.13	0.57	0.15

【表 3】

表 3

OT-I 細胞のうちの IFN- γ および CD44 high 細胞のパーセント			
チャレンジ対照	寛容性対照	B 細胞-Endo	B 細胞-SQZ
79.6	67.8	77.6	54.8

【0370】

（実施例 3）

寛容性を誘導するための T 細胞への抗原の狭窄媒介性の送達

抗原の狭窄媒介性の送達によって生成された細胞内抗原を含有する T 細胞抗原提示細胞（APC）の、in vivo で抗原依存的寛容性を誘導する能力を決定するために、抗原特異的 T 細胞の数および炎症性サイトカイン IFN- γ のレベルをフローサイトメトリーによって測定した。

【0371】

材料および方法

0 日目に雌 OT-I ドナーマウス（CD45.2）から C57BL/6J レシピエントマウス（CD45.1）にマウス毎に 2.5×10^6 個の OVA 特異的 OT-I T 細胞を養子移入した。同日に、狭窄なしでの免疫原性 OVA エピトープ（SIINFEEKL ペプチド、配列番号 1）の存在下でインキュベートした T 細胞または全長 OVA タンパク質の狭窄媒介性の送達を伴う T 細胞のいずれかの、 5×10^6 個の T APC 細胞（CD90.1）もマウスに注射した。8 日目に、ナイーブ（T APC 細胞なし、抗原なし）と対比して、チャレンジ動物において $10 \mu\text{g}$ の OVA タンパク質（抗原）+ 50 ng の LPS（アジュバント）/マウスの皮内注射で抗原チャレンジを行った。12 日目に、抗原チャレンジへの OT-I T 細胞応答を OT-I T 細胞数および IFN- γ 細胞内染色についてのフローサイトメトリーによって測定した。処置スケジュールの図解を図 7 に示し、処置群を表 4 に要約する。

【表 4】

表 4

群	0 日目	8 日目
ナイーブ	OT-I の養子移入	
チャレンジ対照	OT-I の養子移入	OVA + LPS
寛容性対照	OT-I の養子移入お よび狭窄なしで SIINFEKL ペプチド とインキュベートし た T 細胞	OVA + LPS
T 細胞-SQZ	OT-I の養子移入お よび狭窄によって送 達された OVA を有 する T 細胞	OVA + LPS

10

20

【0372】

結果

12 日目に、4 つの処置群のマウスで OT-I 特異的 T 細胞の数を測定した。チャレンジ対照と比べて OVA タンパク質の狭窄媒介性の送達を伴う T 細胞でプライミングしたマウスにおいて流入リンパ節および脾臓の両方で OT-I T 細胞の活性化および増殖は有意に阻害された ($****P < 0.0001$) (図 8)。これらのマウスでは、ナイーブマウスまたは遊離 OVA 寛容性対照と類似の OT-I T 細胞数が見られた。

【0373】

OT-I 特異的 T 細胞の機能に対する T 細胞-SQZ APC 媒介性の寛容性の機能的効果を評価するために、遊離 SIINFEKL ペプチドで再刺激した OT-I T 細胞の IFN- γ 産生レベルを全ての群について評価した (図 9)。チャレンジ対照と比べて、T 細胞-SQZ マウスの OT-I T 細胞は、寛容性対照と同様に ($****P < 0.0001$)、高 IFN- γ 発現細胞のパーセンテージの大きな減少を示した ($****P < 0.0001$)。

30

【0374】

CD8+ T 細胞数と対比した OT-I T 細胞数 (図 10 上パネル) および CD44 抗原活性化マーカーを有すると対比した高 IFN- γ を有する細胞のパーセンテージ (図 10 下パネル) の代表的なフローサイトグラムは、T 細胞-SQZ 動物はチャレンジ対照と比べて OT-I T 細胞および IFN- γ 産生の両方についてより小さい数を有したことを示す (表 5)。

40

【表 5】

表 5

	チャレンジ対照 (%)	ナイーブ(%)	SQZ-OVA (%)	寛容性対照(%)
CD45.2+/CD8+	20.8	1.49	1.52	2.55
IFN- γ および CD44 high	87.1	1.37	15.5	26.0

10

【0375】

(実施例 4 A)

マウス I 型糖尿病モデルにおける予防
序

SQZ によって送達された抗原を含有する抗原提示細胞 (APC、例えば B 細胞および / または T 細胞) の、マウス I 型糖尿病の予防 *in vivo* モデルにおいて抗原依存的寛容性を誘導する能力を決定するために、寛容性誘導後に経時的に毎週血液グルコースレベルを測定する。

【0376】

20

材料および方法

10 週齢時に NOD/ShiLtJ マウスを APC で処置する。0 日目に、NOD/ShiLtJ マウスから APC を回収し、狭窄なしでインスリン B 鎖ペプチド 9~23 (InsB9~23:CKKGS SHLVEALYLVCGERG、配列番号 2) とインキュベートするか、または InsB9~23 を SQZ 条件によって送達した後、レシピエントマウスに 5M APC/マウスを注射する。対照動物には PBS を注射する (チャレンジ対照)。処置後 7 日目 (11 週齢) に開始して、血液グルコース測定を毎週実行する。Bayer Contour Diabetes Meter/Glucose Test Strip による測定で血液グルコースレベルが 260mg/dL を超えたときにマウスは糖尿病であるとみなす。代表的な処置スケジュールの図解を図 11A に示し、処置群を表 6 に要約する。

30

【表 6】

表 6

群	0 日目および 5 日目
チャレンジ対照	PBS
APC-Endo	InsB _{9~23} とインキュ ベートした APC
APC-SQZ	InsB _{9~23} を SQZ し た APC

40

【0377】

(実施例 4 B)

マウス I 型糖尿病モデルの治療
序

SQZ によって送達された抗原を含有する抗原提示細胞 (APC、例えば B 細胞および / または T 細胞) の、マウス I 型糖尿病の治療 *in vivo* モデルにおいて抗原依存的

50

寛容性を誘導する能力を決定するために、マウスでの寛容性誘導後に経時的に毎週血液グルコースレベルを測定する。

【0378】

材料および方法

レシピエントでT1Dの迅速な発症を誘導するために、BDC2.5 NODマウスからCD4⁺ T細胞を回収し、p31ミメトープ(mimotope)ペプチド(YVRPLWVRME、配列番号3)で4日間*ex vivo*で活性化し、正常血糖のNODレシピエントに養子移入する(5M細胞/マウス)。養子移入の8時間後に寛容性誘導を開始し、3日毎、計3回の投与となるように繰り返す。レシピエントをPBS(チャレンジ対照)またはp31とインキュベートした(APC-Endo)もしくはp31をSQZによって送達した(APC-SQZ)5M APCで処置する。Bayer Contour Diabetes Meter/Glucose Test Stripによって血液グルコースを毎日測定する。血液グルコースレベルが260mg/dLを超えたときにマウスを糖尿病とみなす。代表的な処置スケジュールの図解を図11Bに示し、処置群を表7に要約する。

【表7】

表7

群	0日目および5日目
チャレンジ対照	PBS
APC-Endo	InsB _{9~23} とインキュベートしたAPC
APC-SQZ	InsB _{9~23} をSQZしたAPC

【0379】

(実施例5A)

マウスMS型自己免疫障害の予防 序

SQZによって送達された抗原を含有する抗原提示細胞(APC、例えばB細胞および/またはT細胞)の、マウスMS型自己免疫障害の*in vivo*予防モデルにおいて抗原依存的寛容性を誘導する能力を決定するために、運動性の臨床スコアを経時的に毎日評価する。

【0380】

材料および方法

雌C57BL/6マウス(10~12週齢)を実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の誘導前にAPCで処置する。7日目にC57BL/6マウスからAPCを回収し、狭窄なしでミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド35~55(MOG_{35~55}:MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKGS、配列番号4)とインキュベートするか、またはMOG_{35~55}もしくはOVA_{323~339}ペプチド(陰性対照:ISQAVHAHAHAINEAGRGS、配列番号5)をSQZ条件によってAPCに送達した後、レシピエントマウスに5M APC/マウスを注射する。0日目に、CFA中のMOG_{35~55}およびPBS中の百日咳毒素(Hooker kit)の投与によってEAEを誘導する。7日目に開始してマウスを毎日スコア付けする。臨床スコアは以下の通りに定義する:1. 尾の引きずり;2. 部分的な後肢の麻痺;3. 完全な後肢の麻痺;4. 完全な後肢および部分的な前肢の麻痺;および5. 瀕死。代表的な処置スケジュールの図解を図12Aに示し、処置群を表8に要約する。

【表 8】

表 8

群	-7 日目	0 日目(EAE の誘導)
チャレンジ対照	OVA _{323~339} を SQZ した APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素
APC-Endo	MOG _{35~55} とインキュベートした APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素
APC-SQZ	MOG _{35~55} を SQZ した APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素

10

【0381】

(実施例 5 B)

マウス M S 型自己免疫障害の治療
序

S Q Z によって送達された抗原を含有する抗原提示細胞 (A P C、例えば B 細胞および / または T 細胞) の、確立されたマウス M S 型自己免疫障害の *i n v i v o* モデルにおいて抗原依存的寛容性を誘導する能力を決定するために、運動性の臨床スコアを経時的に毎日評価する。

20

【0382】

材料および方法

雌 C 5 7 B L / 6 マウス (10 ~ 12 週齢) において、0 日目に C F A 中の M O G _{3 5 ~ 5 5} および P B S 中の百日咳毒素 (H o o k e k i t) の投与によって実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E) を誘導する。次いで、下記の運動性基準に基づいてマウスが 1 以上のスコアとなった日である E A E の発症日に、マウスを A P C で処置する。約 11 / 12 日目に C 5 7 B L / 6 マウスから B 細胞を回収し、狭窄なしでミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド 35 ~ 55 (M O G _{3 5 ~ 5 5} : M E V G W Y R S P F S R V V H L Y R N G K G S、配列番号 4) とインキュベートするか、または M O G _{3 5 ~ 5 5} もしくは O V A _{3 2 3 ~ 3 3 9} ペプチド (陰性対照: I S Q A V H A A H A E I N E A G R G S、配列番号 5) を S Q Z 条件によって A P C に送達した後、レシピエントマウスに 5 M A P C / マウスを注射する。19 日目に開始してマウスを毎日スコア付けする。臨床スコアは以下の通りに定義する: 1. 尾の引きずり; 2. 部分的な後肢の麻痺; 3. 完全な後肢の麻痺; 4. 完全な後肢および部分的な前肢の麻痺; および 5. 瀕死。代表的な処置スケジュールの図解を図 12 B に示し、処置群を表 9 に要約する。

30

【表 9】

表 9

群	-7 日目	0 日目(EAE の誘導)
チャレンジ対照	OVA _{323~339} を SQZ した APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素
APC-Endo	MOG _{35~55} とインキュベートした APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素
APC-SQZ	MOG _{35~55} を SQZ した APC	MOG _{35~55} + 百日咳毒素

10

【表 10】

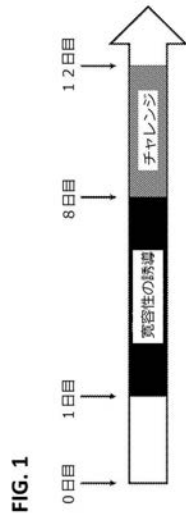
配列表

配列番号	配列	説明
1	SIINFEKL	CD8+活性 OVA エピトープ
2	CKKGSSHLVEALYLVCGERG	B 鎖ペプチド 9~23(InsB _{9~23})
3	YVRPLWVRME	p31 ミメトープ(mimetope)ペプチド
4	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKGS	ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド 35~55(MOG _{35~55})
5	ISQAVHAAHAEINEAGRGS	OVA _{323~339} ペプチド

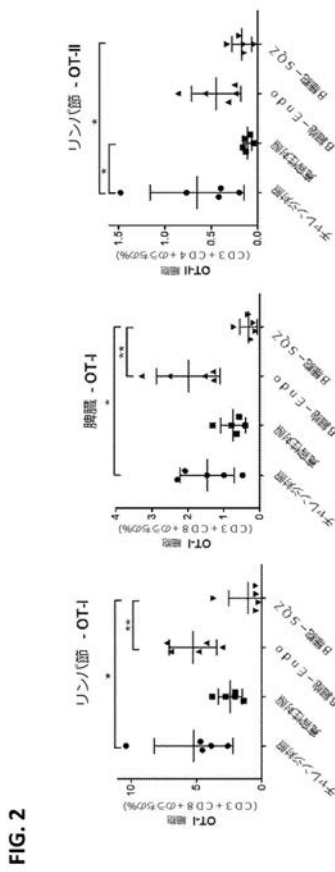
20

30

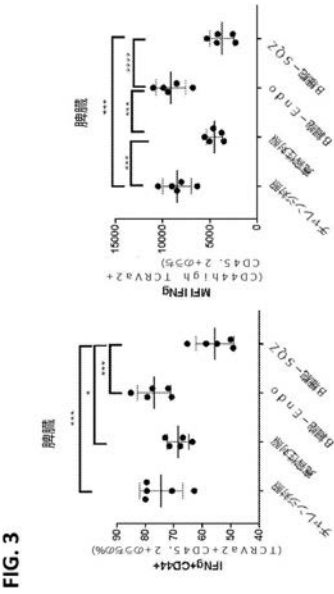
【図 1】



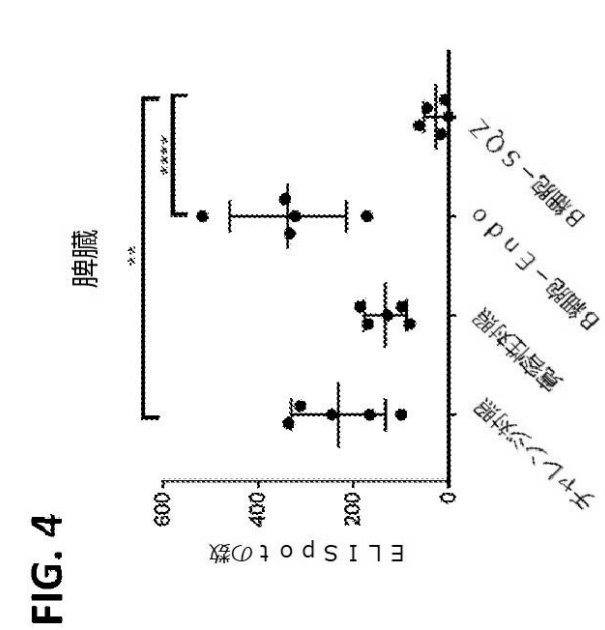
【図 2】



【図 3】

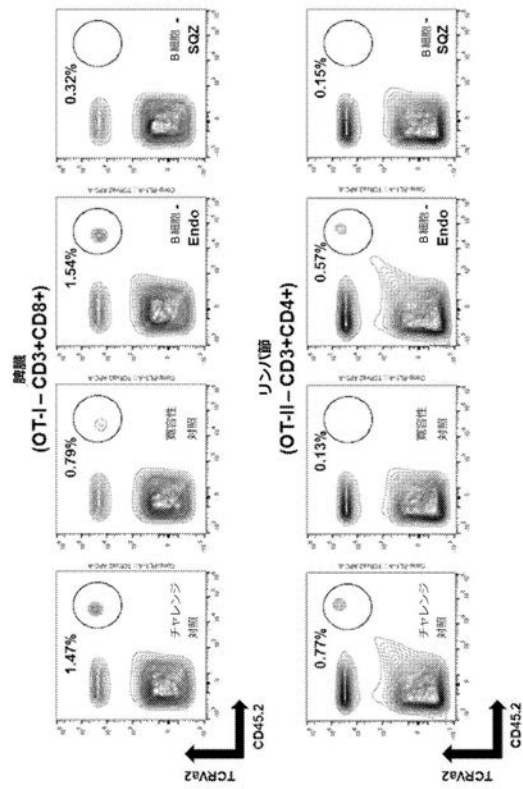


【図 4】



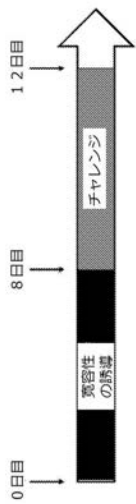
【図 5】

FIG. 5



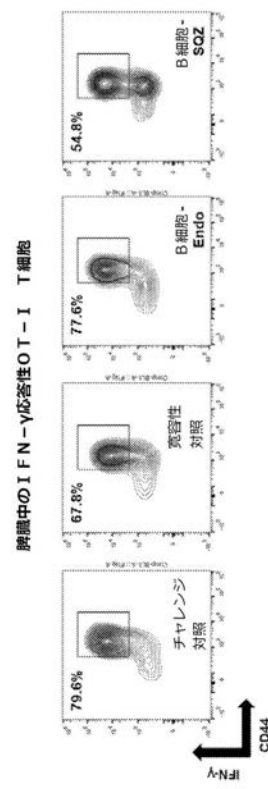
【図 7】

FIG. 7



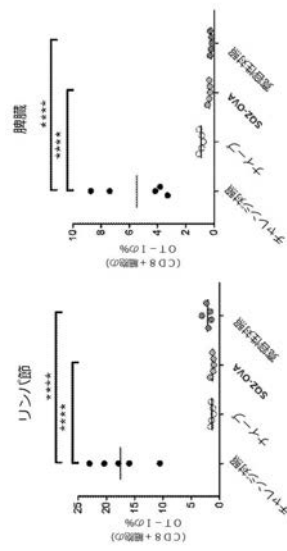
【図 6】

FIG. 6



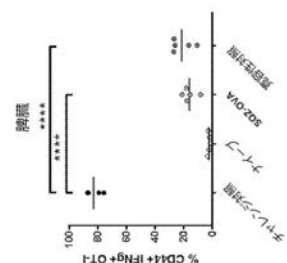
【図 8】

FIG. 8



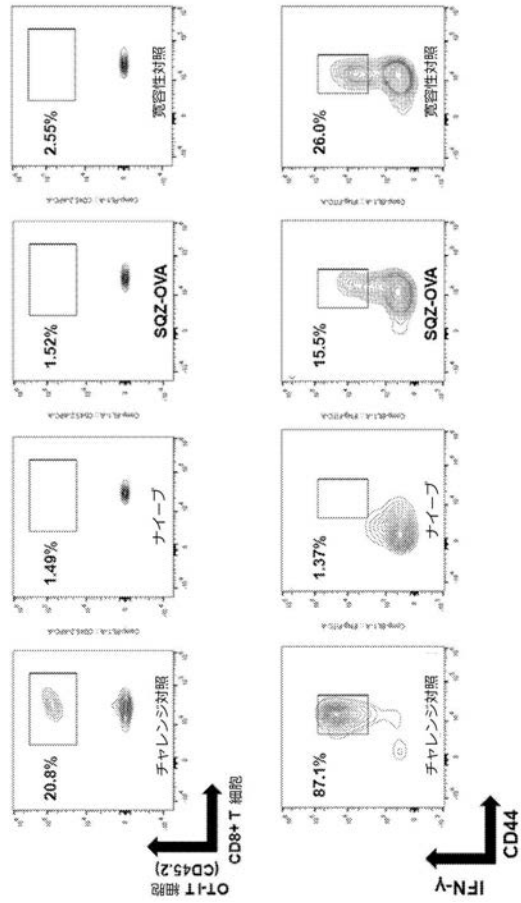
【図 9】

FIG. 9



【図 10】

FIG. 10



【図 12】

FIG. 12A

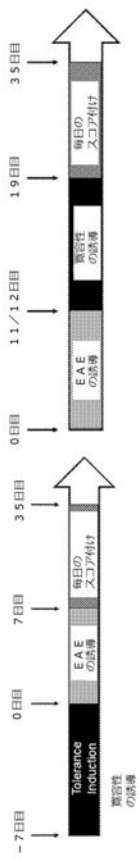
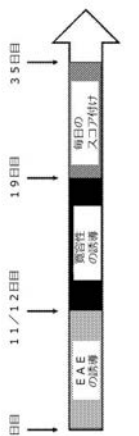


FIG. 12B



【図 11】

FIG. 11A

(1.0週において)

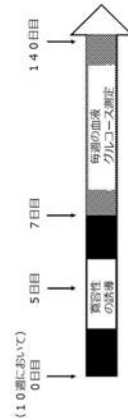
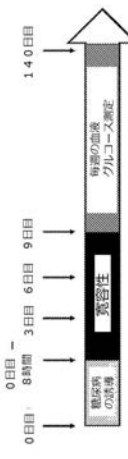


FIG. 11B



【配列表】

20195180090000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/030933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K35/17 A61K35/15 A61P37/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2016/070136 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 6 May 2016 (2016-05-06) cited in the application the whole document	1-80, 82-189
Y, P	WO 2017/041050 A1 (SQZ BIOTECHNOLOGIES COMPANY [US]) 9 March 2017 (2017-03-09) the whole document	1-189
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2017		Date of mailing of the international search report 21/07/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Greif, Gabriela

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/030933

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	MARTIN P. STEWART ET AL: "In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery", NATURE, vol. 538, no. 7624, 12 October 2016 (2016-10-12), pages 183-192, XP055388055, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature19764 the whole document -----	1-189
X	WO 2013/059343 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; SHAREI ARMON [US]; ADAMO ANDREA [U] 25 April 2013 (2013-04-25) cited in the application the whole document and see especially claims 1,15,55 and example 3 -----	1-189
Y	WO 03/020039 A1 (RUSH PRESBYTERIAN ST LUKE [US]; GALILI URI [US]) 13 March 2003 (2003-03-13) the whole document -----	1-189
Y	STEINMAN RALPH M ET AL: "Tolerogenic dendritic cells", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC, US, vol. 21, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 685-711, XP002433336, ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.21.120601.141040 the whole document -----	1-189
Y	RUTELLA SERGIO ET AL: "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 108, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1435-1440, XP002648261, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2006-03-006403 [retrieved on 2006-05-09] the whole document -----	1-189
Y	WO 02/067863 A2 (SCEPENS EYE RES INST INC [US]; STEIN-STREILEIN JOAN [US]; STREILEIN J) 6 September 2002 (2002-09-06) the whole document -----	1-189
Y	US 2008/311140 A1 (LEE BRENDAN [US] ET AL) 18 December 2008 (2008-12-18) the whole document -----	1-189

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/030933

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016070136 A1	06-05-2016	AU 2015338893 A1 CA 2964392 A1 SG 11201703044P A WO 2016070136 A1	04-05-2017 06-05-2016 30-05-2017 06-05-2016
WO 2017041050 A1	09-03-2017	NONE	
WO 2013059343 A1	25-04-2013	AU 2012326203 A1 BR 112014009346 A2 CA 2852672 A1 CN 103987836 A EP 2768942 A1 JP 2014533936 A KR 20140116374 A RU 2014119926 A US 2014287509 A1 WO 2013059343 A1	15-05-2014 18-04-2017 25-04-2013 13-08-2014 27-08-2014 18-12-2014 02-10-2014 27-11-2015 25-09-2014 25-04-2013
WO 03020039 A1	13-03-2003	US 2004234511 A1 WO 03020039 A1	25-11-2004 13-03-2003
WO 02067863 A2	06-09-2002	AU 2002252073 A1 WO 02067863 A2	12-09-2002 06-09-2002
US 2008311140 A1	18-12-2008	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T E F L O N

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ラフヘッド, スコット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, クーリッジ アベニュー 1 3 4, スクイーズ バイオテクノロジーズ カンパニー 気付

(72)発明者 ギルバート, ジョナサン ビー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, クーリッジ アベニュー 1 3 4, スクイーズ バイオテクノロジーズ カンパニー 気付

(72)発明者 バーンスタイン, ハワード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, クーリッジ アベニュー 1 3 4, スクイーズ バイオテクノロジーズ カンパニー 気付

(72)発明者 シャレイ, アーモン アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, クーリッジ アベニュー 1 3 4, スクイーズ バイオテクノロジーズ カンパニー 気付

(72)発明者 ムーア, フィノラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, クーリッジ アベニュー 1 3 4, スクイーズ バイオテクノロジーズ カンパニー 気付

F ターム(参考) 4B065 AA91X AB01 CA44

4C084 AA02 AA13 AA19 BA03 DA58 NA20 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112
ZB131 ZB132 ZC41

4C085 AA14 CC01

4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BB65 NA20 ZB08 ZB11 ZB13 ZC41