(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-545582
(P2024-545582A)
(43)公表日　令和6年12月10日(2024.12.10)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/19	ＺＮＡ　４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全89頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-527628(P2024-527628)
(86)(22)出願日　令和4年11月14日(2022.11.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月28日(2024.6.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079843
(87)国際公開番号　WO2023/087009
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　63/278,447
(32)優先日　令和3年11月11日(2021.11.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　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,
最終頁に続く

(71)出願人　518393115
ステムセル テクノロジーズ カナダ インコーポレイテッド
カナダ ブイ６エー １ビー６ ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ステーション ストリート １６１８ スイート ５００
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　マイクロ流体送達による増強された腫瘍浸潤リンパ球を作製する方法

(57)【要約】
本出願は、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を増強する因子を含むＴＩＬ、そのようなＴＩＬを製造する方法、及び免疫反応を増強するためそのように改変されたＴＩＬを使用する方法を提供する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）でのグランザイムＢの発現を増加させる方法であって、（ａ）前記ＴＩＬを改変して、（ｉ）共刺激分子、（ｉｉ）サイトカイン、または（ｉｉ）共刺激分子とサイトカインの両方の発現が増加するようにすることと、（ｂ）外因性サイトカインの非存在下で前記ＴＩＬを培養することと、を含み、前記改変及び前記培養の後、前記ＴＩＬは、活性化時に、改変されていない対応するＴＩＬ（参照ＴＩＬ）よりも高いグランザイムＢの発現を示す、前記方法。
【請求項２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）でのグランザイムＢの発現を増加させる方法であって、外因性サイトカインの非存在下で前記ＴＩＬを培養することを含み、ここで前記ＴＩＬは、（ｉ）共刺激分子、（ｉｉ）サイトカイン、または（ｉｉｉ）共刺激分子とサイトカインの両方の発現が増加するよう改変されており、前記培養後、前記ＴＩＬは、活性化時に、改変されていない対応するＴＩＬ（参照ＴＩＬ）よりも高い増殖を示す、前記方法。
【請求項３】
前記グランザイムＢの発現は、前記参照ＴＩＬよりも、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約３．５倍、少なくとも約４倍、少なくとも約４．５倍、少なくとも約５倍、少なくとも約５．５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約６．５倍、少なくとも約７倍、少なくとも約７．５倍、少なくとも約８倍、少なくとも約８．５倍、少なくとも約９倍、少なくとも約９．５倍、または少なくとも約１０倍増加する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記培養を少なくとも約１日間、少なくとも約２日間、または少なくとも約３日間行う、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記共刺激分子がＣＤ８６である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記サイトカインが、膜結合型ＩＬ－２、膜結合型ＩＬ－１２、またはそれらの両方を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記改変は、前記ＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより前記ＴＩＬに摂動を生じさせ、前記共刺激分子をコードする核酸及び／または前記サイトカインをコードする核酸が前記ＴＩＬに接触させられると前記摂動部を通って前記ＴＩＬに入るようにすることを含む、請求項１及び３～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記改変は、前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸と前記ＴＩＬとを接触させることをさらに含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、前記投入したＴＩＬに摂動を生じさせ、前記共刺激分子をコードする核酸及び／または前記サイトカインをコードする核酸が前記投入したＴＩＬに接触させられると前記ＴＩＬに入るようにすることによって、前記ＴＩＬを改変し、前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸の後、前記投入されたＴＩＬは、前記共刺激分子及び／または前記サイトカインの発現の増加を示し、改変されたＴＩＬとなる、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸と前記細胞懸濁液とを接触させることをさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】

前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記細胞懸濁液を、前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸と接触させる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させている間に、前記細胞懸濁液を、前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸と接触させる、請求項１０または１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させている間に、前記細胞懸濁液を、前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸と接触させる、請求項１０～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記共刺激分子をコードする前記核酸及び／または前記サイトカインをコードする前記核酸が、ｍＲＮＡである、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記細胞変形用狭窄部は、前記ＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％の幅を有する、請求項７～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞変形用狭窄部は、前記投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％の幅を有する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記狭窄部の幅は、約３．５μｍ～約４．２μｍ、または約３．５μｍ～約４．８μｍ、または約３．５μｍ～約６μｍ、または約５μｍ～約１２μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記狭窄部の幅は、約３μｍ～約５μｍである。請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記狭窄部の幅は約４μｍである、請求項１８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１１月１１日に出願された米国仮出願第６３／２７８，４４７号の優先権を主張するものであり、該仮出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＥＦＳＷＥＢ経由で電子出願された配列表の参照
本出願において電子出願された配列表（４８２１＿０７９ＰＣ０４＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６．ｘｍｌ、サイズ：２０，１６５バイト、作成日：２０２２年１１月９日）の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
本開示は、概して、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を増強する因子を含むＴＩＬ、そのようなＴＩＬを製造する方法、及び免疫反応を増強するため、そのように改変されたＴＩＬを使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）療法の開発にはさまざまな課題が伴う。ＴＩＬ療法は患者の固形腫瘍に顕著な活性を示すが、現在のＴＩＬ組成物は、臨床活性をサポートするために、患者のリンパ球を枯渇させること及び細胞注入後に高用量ＩＬ－２を維持することが

必要である。ｍＲＮＡを用いたＴＩＬ生成物の生体外工学により、効力を向上させることができ、治療を受けられる患者の数を増やすことができ、反復投与や他の治療法との併用治療が可能になる可能性がある。

【０００５】

特許出願及び公報を含む、本明細書で引用する全ての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。特に特許公開公報第ＷＯ２０１６０７０１３６号、第ＵＳ２０１８０１４２１９８号、第ＷＯ２０１７００８０６３号、第ＵＳ２０１８０２０１８８９号、第ＷＯ２０１９１７８００５号、第ＷＯ２０１９１７８００６号、及び第ＷＯ２０２０１７６７８９号は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【０００６】

本明細書では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）でのグランザイムＢの発現を増加させる方法を提供し、該方法は、（ａ）ＴＩＬを改変して、（ｉ）共刺激分子、（ｉｉ）サイトカイン、または（ｉｉ）共刺激分子とサイトカインの両方の発現が増加するようにすることと、（ｂ）外因性サイトカインの非存在下で該ＴＩＬを培養することと、を含み、該改変及び該培養の後、該ＴＩＬは、活性化時に、改変されていない対応するＴＩＬ（参照ＴＩＬ）よりも高いグランザイムＢの発現を示す。

【０００７】

本開示はさらに、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）でのグランザイムＢの発現を増加させる方法を提供し、該方法は、外因性サイトカインの非存在下でＴＩＬを培養することを含み、ここで該ＴＩＬは、（ｉ）共刺激分子、（ｉｉ）サイトカイン、または（ｉｉｉ）共刺激分子とサイトカインの両方の発現が増加するよう改変されており、該培養後、該ＴＩＬは、活性化時に、改変されていない対応するＴＩＬ（参照ＴＩＬ）よりも高い増殖を示す。

【０００８】

いくつかの態様では、グランザイムＢの発現は、参照ＴＩＬによる発現よりも、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約３．５倍、少なくとも約４倍、少なくとも約４．５倍、少なくとも約５倍、少なくとも約５．５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約６．５倍、少なくとも約７倍、少なくとも約７．５倍、少なくとも約８倍、少なくとも約８．５倍、少なくとも約９倍、少なくとも約９．５倍、または少なくとも約１０倍高い。

【０００９】

いくつかの態様では、培養は少なくとも約１日間、少なくとも約２日間、または少なくとも約３日間行われる。いくつかの態様では、共刺激分子はＣＤ８６である。いくつかの態様では、サイトカインは膜結合型ＩＬ－２、膜結合型ＩＬ－１２、またはそれらの両方を含む。

【００１０】

いくつかの態様では、改変は、ＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることによりＴＩＬに摂動を生じさせ、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸がＴＩＬに接触させられると摂動部を通ってＴＩＬに入るようにすることを含む。いくつかの態様では、改変は、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸とＴＩＬとを接触させることをさらに含む。

【００１１】

いくつかの態様では、投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、投入したＴＩＬに摂動を生じさせ、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸が投入したＴＩＬに接触させられるとＴＩＬに入るようにすることによって、ＴＩＬを改変し、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸が入った後、投入したＴＩＬは、共刺激分子及び／またはサイトカインの発現の増加を示し、改変されたＴＩＬとなる。

【００１２】

いくつかの態様では、上記方法はさらに、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸と細胞懸濁液とを接触させることを含む。いくつかの態様では、細胞懸濁液を、細胞変形用狭窄部に通過させる前に、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸と接触させる。いくつかの態様では、細胞懸濁液を、細胞変形用狭窄部に通過させている間に、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸と接触させる。いくつかの態様では、細胞懸濁液を、細胞変形用狭窄部に通過させる間に、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸と接触させる。

【００１３】

いくつかの態様では、共刺激分子をコードする核酸及び／またはサイトカインをコードする核酸は、ｍＲＮＡである。

【００１４】

いくつかの態様では、細胞変形用狭窄部は、ＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％の幅を有する。いくつかの態様では、細胞変形用狭窄部は、投入されたＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％の幅を有する。いくつかの態様では、狭窄部の幅は、約３．５μｍ～約４．２μｍ、または約３．５μｍ～約４．８μｍ、または約３．５μｍ～約６μｍ、または約５μｍ～約１２μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍである。いくつかの態様では、狭窄部の幅は約３μｍ～約５μｍである。いくつかの態様では、狭窄部の幅は約４μｍである。

【００１５】

いくつかの態様では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの態様では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子の発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、共刺激分子は、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である。いくつかの実施形態では、共刺激分子はＣＤ８６である。いくつかの態様では、本発明は、ＴＩＬの表現型及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。

【００１６】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、ＴＩＬを改変して膜結合型キメラサイトカインを含有させるようにする。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインはペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは（Ｇ４Ｓ）３（配列番号３）または（ＥＡＡＡＫ）３（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｉ型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、もしくはＩＬ－２１、またはそれらの機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体及び／またはＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む。

【００１７】

本発明のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、該ＴＩＬを、以下のａ）及びｂ）を含む方法によって調製する。すなわち、該ＴＩＬを、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする

１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製する。本発明のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、該ＴＩＬを、以下のａ）及びｂ）を含む方法によって調製する。すなわち、該ＴＩＬを、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製する。いくつかの実施形態では、該方法は、（ａ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｂ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｃ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、または（ｄ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、（ａ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｂ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｃ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、または（ｄ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、核酸の１つ以上はｍＲＮＡである。

【００１８】

本発明のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超増加している。

【００１９】
本発明のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるグランザイムＢの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍以上増加している。

【００２０】
いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは、ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であり、場合により、外因性サイトカインはＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍は自己腫瘍である。

【００２１】
いくつかの態様では、本発明は、１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変された改変されたＴＩＬを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、改変されたＴＩＬを含む組成物であって、該ＴＩＬが１つ以上の共刺激分子の発現が増加するように改変されている組成物を提供する。いくつかの実施形態では、共刺激分子は、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である。いくつかの実施形態では、共刺激分子はＣＤ８６である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている。いくつかの態様では、本発明は、膜結合型キメラサイトカインを含むように改変されたＴＩＬを含む組成物を提供する。

【００２２】
本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、（Ｇ４Ｓ）３（配列番号３）または（ＥＡＡＡＫ）３（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩ型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、もしくはＩＬ－２１、またはそれらの機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体、及び／または、ＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む。

【００２３】
本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、該改変されたＴＩＬは、以下のａ）及びｂ）を含む方法によって調製されている。すなわち、該ＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入

したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製されている。いくつかの実施形態では、該ＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、該ＴＩＬは、以下のａ）及びｂ）を含む方法によって調製されている。すなわち、該ＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして摂動された投入したＴＩＬに入りこませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製されている。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを調製する方法は、（ａ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｂ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｃ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、または（ｄ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを調製する方法は、（ａ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｂ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、（ｃ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすること、または（ｄ）細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、核酸の１つ以上はｍＲＮＡである。

【００２４】

本明細書に記載の組成物のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超増加している。

【００２５】

本発明のいくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴ

ＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるグランザイムＢの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍以上増加している。

【００２６】

いくつかの実施形態では、組成物の改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは、ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であり、場合により、外因性サイトカインはＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍は自己腫瘍である。

【００２７】

いくつかの態様では、本発明は、個体において免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、改変されたＴＩＬを個体に投与することを含み、改変されたＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って調製されたものである。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物を投与することを含む、個体において免疫反応を調節する方法を提供する。

【００２８】

いくつかの態様では、本発明は、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、改変されたＴＩＬを個体に投与することを含み、改変されたＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って調製されたものである。いくつかの実施形態では、本発明は、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、改変されたＴＩＬを複数回投与すること、または組成物を複数回投与することを含む。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを、静脈内または腫瘍内に投与する。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与する。

【００２９】

いくつかの態様では、本発明は、個体において免疫反応を刺激するための医薬組成物を提供し、該組成物は本明細書に記載の組成物の有効量を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、医薬として使用するための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の組成物の有効量を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の組成物の有効量を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与される、改変されたＴＩＬを含む。

【００３０】

本明細書に記載の狭窄部による送達のいくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約３．５μｍ～約４．２μｍ、または約３．５μｍ～約４．８μｍ、または約３．５μｍ～約６μｍ、または約５μｍ～約１２μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４μｍである。いくつかの実施形態では、複数の投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を、複数の狭窄部に通過させ、ここで複数の狭窄部は、直列及び／または並列に配置されている。

【００３１】
いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の方法のいずれかで使用するためのキットを提供する。いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットはさらに、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、注射器、または組成物の個体への投与に関する説明書を含む添付文書のうちの１つ以上を含む。
【００３２】
いくつかの態様では、本発明は、膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬを作製する方法を提供し、該方法は、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸をＴＩＬに導入することを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートして、該核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸を発現させ、それによって、膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬを生成させることと、により調製される。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約５μｍ～約１２μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約１０μｍである。いくつかの態様では、狭窄部の幅は約８μｍである。いくつかの実施形態では、複数の投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を、複数の狭窄部に通過させ、ここで複数の狭窄部は、直列及び／または並列に配置されている。いくつかの態様では、本発明は、個体において免疫反応を刺激するための医薬の製造における医薬組成物の使用を提供し、該医薬組成物は本明細書に記載の組成物の有効量を含む。いくつかの態様では、本発明は、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬の製造における医薬組成物の使用を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の組成物の有効量を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、複数回投与用に処方されている。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内または腫瘍内に投与される。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与されるように処方されている。
【図面の簡単な説明】
【００３３】
【図１Ａ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の、送達後さまざまな時点での、生存率を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」、たとえば、細胞を狭窄部による送達によって処理しなかった）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。
【図１Ｂ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩ

Ｌ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ＧＦＰ発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図１Ｃ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ｍｂＩＬ－２発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図１Ｄ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ｍｂＩＬ－１２発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図２Ａ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ＧＦＰ発現について平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図２Ｂ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ｍｂＩＬ－２発現について平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図２Ｃ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球における、送達後のさまざまな時点での、ｍｂＩＬ－１２発現について平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）、空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）、及びｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされるＧＦＰを、対照として用いた。

【図３】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の生存率を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図４】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の増殖を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図５】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍ

Ｌ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ３９＋発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図６】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ３９＋ＣＤ６９＋発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図７】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６２Ｌ＋発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図８Ａ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｂ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｃ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｄ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｅ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｆ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｇ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２

（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。

【図８Ｈ】狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６９＋発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図９】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球におけるｍｂＩＬ－２の発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１０】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球におけるｍｂＩＬ－１２の発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１１】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球におけるｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方の発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１２】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＴ－ｂｅｔ＋発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１３】Ａ～Ｄは、狭窄部によるｍＲＮＡ送達によってもたらされ、その後異なる濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、または０ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で培養された、膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）、膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＥｏｍｅｓ＋とＴＣＦ－１＋の発現を示す図である。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１４】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の生存率と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－

２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の生存率とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図１４Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図１４Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１５】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の増殖と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球の増殖とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図１５Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図１５Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１６】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ３９＋発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ３９＋発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図１６Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図１６Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１７】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６２Ｌ＋発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ６２Ｌ＋発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図１７Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図１７Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１８】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ８６＋発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＣＤ８６＋発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図１８Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図１８Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１９Ａ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ

－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１９Ｂ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１９Ｃ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図１９Ｄ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図２０Ａ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）と膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。

【図２０Ｂ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）と膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後に０ＩＵ／ｍＬのいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえ

ば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２０Ｃ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）と膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２０Ｄ】０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）と膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のｍｂＩＬ－１２発現の平均蛍光強度（「ＭＦＩ」）とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２１】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＴ－ｂｅｔ＋発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＴ－ｂｅｔ発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図２１Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図２１Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２２】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＥｏｍｅｓ＋発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＥｏｍｅｓ＋発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図２２Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図２２Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２３】Ａ～Ｂは、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、または０．５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされた膜結合型ＩＬ－２（「ｍｂＩＬ－２」）と膜結合型ＩＬ－１２（「ｍｂＩＬ－１２」）の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＥｏｍｅｓ＋とＴＣＦ－１の発現と、０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡの狭窄部による送達によってもたらされたＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２、ＣＤ８６及びｍｂ－ＩＬ１２、ならびにＣＤ８６及びｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現する腫瘍浸潤リンパ球のＥｏｍｅｓ＋とＴＣＦ－１の発現とを示す図である。腫瘍浸潤リンパ球を、ｍＲＮＡ送達後、３０００ＩＵ／ｍＬ（図２３Ａ）または０ＩＵ／ｍＬ（図２３Ｂ）のいずれかのＩＬ－２を含む培地中で培養した。これらの実験では、非接触（「ＮＣ」）及び空の圧迫（たとえ

ば、狭窄部による送達を投入材料なしで行った）を対照として用いた。
【図２４Ａ】指定した総量のｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを圧迫により導入したヒト腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）または投入材料なしで圧迫処理したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）における生存細胞の百分率を経時的に示す図である。
【図２４Ｂ】指定した総量のｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを圧迫により導入したＴＩＬまたは投入材料なしで圧迫処理したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）における、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２を発現する細胞の百分率を経時的にそれぞれ示す図である。
【図２４Ｃ】指定した総量のｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを圧迫により導入したＴＩＬまたは投入材料なしで圧迫処理したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）における、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２を発現する細胞の百分率を経時的にそれぞれ示す図である。
【図２４Ｄ】指定した総量のｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを圧迫により導入したＴＩＬまたは投入材料なしで圧迫処理したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）における、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２の圧迫後１日目の代表的発現をそれぞれ示す図である。
【図２４Ｅ】指定した総量のｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを圧迫により導入したＴＩＬまたは投入材料なしで圧迫処理したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）における、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２の圧迫後１日目の代表的発現をそれぞれ示す図である。
【図２５】Ａ及びＢは、３人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを、投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫瘍細胞と３日間共培養したＴＩＬにおいて、フローサイトメトリーにより測定した生存ＣＤ８＋Ｔ細胞の数及びＫｉ６７陽性細胞の百分率をそれぞれ示す図と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で３日間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）において、フローサイトメトリーにより測定した生存ＣＤ８＋Ｔ細胞の数及びＫｉ６７陽性細胞の百分率をそれぞれ示す図である。
【図２６】３人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを、投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫瘍細胞と３日間共培養したＴＩＬにおいて、フローサイトメトリーにより測定したグランザイムＢ（ＧＺＭＢ）陽性細胞の百分率と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で３日間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）において、フローサイトメトリーにより測定したグランザイムＢ（ＧＺＭＢ）陽性細胞の百分率とを示す図である。
【図２７Ａ】２人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫瘍細胞と２４時間共培養したＴＩＬによって殺傷される腫瘍の量と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で２４時間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）によって殺傷される腫瘍の量とを示す蛍光画像である。
【図２７Ｂ】２人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫瘍細胞と２４時間共培養したＴＩＬによって殺傷される腫瘍の量と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で２４時間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）によって殺傷される腫瘍の量とを示す蛍光画像である。
【図２７Ｃ】２人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫

瘍細胞と２４時間共培養したＴＩＬによって殺傷される腫瘍の量と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で２４時間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）によって殺傷される腫瘍の量とを示す散布図である。

【図２７Ｄ】２人のヒト黒色腫患者から採取したＴＩＬを投入材料なしで圧迫処理した（対照ＴＩＬ）か、ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡと共に圧迫処理したか、またはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫処理し、外因性サイトカインの非存在下で自己腫瘍細胞と２４時間共培養したＴＩＬによって殺傷される腫瘍の量と、投入材料なしで圧迫処理した後、外因性ＩＬ－２及びＩＬ－１２の存在下で２４時間自己腫瘍細胞と共培養したＴＩＬ（対照ＴＩＬ＋ｒｈＩＬ－２＋１２）によって殺傷される腫瘍の量とを示す散布図である。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

いくつかの態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、該ＴＩＬを、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含むＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製する。いくつかの態様では、本明細書では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸をＴＩＬに細胞内送達することを含む。いくつかの態様では、本明細書では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法が提供し、該方法は、１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸をＴＩＬに細胞内送達することを含む。いくつかの態様では、本明細書では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、（ｉ）１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸、及び（ｉｉ）１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を、ＴＩＬに細胞内送達することを含む。

【００３５】

したがって、いくつかの態様では、本明細書では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、ＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることによって、ＴＩＬに摂動を生じさせ、（ｉ）１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸、（ｉｉ）１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方が、ＴＩＬと接触させられたときに、摂動部を通ってＴＩＬに入り込むようにすることを含む。いくつかの態様では、そのような方法はさらに、ＴＩＬを（ｉ）１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸、（ｉｉ）１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸、または（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方に接触させること含んでもよい。本明細書でさらに説明するように、いくつかの態様では、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子は、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節することができる。

【００３６】

いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するよう

に改変されている。したがって、いくつかの態様では、本明細書では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該改変されたＴＩＬは、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも高い１つ以上の共刺激分子の発現を示す。いくつかの態様では、本明細書では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該改変されたＴＩＬは、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも高い１つ以上のサイトカインの発現を示す。いくつかの態様では、本明細書では、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも高い１つ以上のサイトカインと１つ以上の共刺激分子の両方の発現を示す改変されたＴＩＬを含む組成物を提供する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該改変されたＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製されている。したがって、いくつかの態様では、本明細書に記載の改変されたＴＩＬは、細胞変形用狭窄部を通過しており、該細胞変形用狭窄部は、ＴＩＬを変形させてＴＩＬに摂動を生じさせており、その結果、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸は、ＴＩＬと接触させられたときに、摂動部を通ってＴＩＬに入り込んでいる。いくつかの態様では、本明細書に記載の改変されたＴＩＬは、細胞変形用狭窄部を通過しており、該細胞変形用狭窄部は、ＴＩＬを変形させてＴＩＬに摂動を生じさせており、その結果、１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が、ＴＩＬと接触させられたときに、摂動部を通ってＴＩＬに入り込んでいる。いくつかの態様では、本明細書に記載の改変されたＴＩＬは、細胞変形用狭窄部を通過しており、該細胞変形用狭窄部は、ＴＩＬを変形させてＴＩＬに摂動を生じさせており、その結果、（ｉ）１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸と（ｉｉ）１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸の両方が、ＴＩＬと接触させられたときに、摂動部を通ってＴＩＬに入り込んでいる。

【００３８】

いくつかの態様では、膜結合型キメラサイトカインを含む改変されたＴＩＬを作製する方法を提供し、該方法は、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸をＴＩＬに導入することを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインを含む改変されたＴＩＬを作製する方法を提供し、該方法は、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートして、該核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸を発現させ、それによって、膜結合型キメラサイトカインを含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む。

【００３９】

本明細書において記載または参照される技術及び手順は、通常、従来法により当業者が良く理解し一般的に使用するものである。そのような技術及び手順には、たとえば、以下に記載されている広く普及した方法がある。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ

Laboratory Manual（Sambrook et al.，4th ed.，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，2012）、Current Protocols in Molecular Biology（F.M.Ausubel，et al.eds.，2003）、the series Methods in Enzymology（Academic Press，Inc.）、PCR 2：A Practical Approach（M.J.MacPherson，B.D.Hames and G.R.Taylor eds.，1995）、Antibodies，A Laboratory Manual（Harlow and Lane，eds.，1988）、Culture of Animal Cells：A Manual of Basic Technique and Specialized Applications（R.I.Freshney，6th ed.，J.Wiley and Sons，2010）、Oligonucleotide Synthesis（M.J.Gait，ed.，1984）、Methods in Molecular Biology，Humana Press、Cell Biology：A Laboratory Notebook（J.E.Cellis，ed.，Academic Press，1998）、Introduction to Cell and Tissue Culture（J.P.Mather and P.E.Roberts，Plenum Press，1998）、Cell and Tissue Culture：Laboratory Procedures（A.Doyle，J.B.Griffiths，and D.G.Newell，eds.，J.Wiley and Sons，1993－8）、Handbook of Experimental Immunology（D.M.Weir and C.C.Blackwell，eds.，1996）、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells（J.M.Miller and M.P.Calos，eds.，1987）、PCR：The Polymerase Chain Reaction，（Mullis et al.，eds.，1994）、Current Protocols in Immunology（J.E.Coligan et al.，eds.，1991）、Short Protocols in Molecular Biology（Ausubel et al.，eds.，J.Wiley and Sons，2002）、Immunobiology（C.A.Janeway et al.，2004）、Antibodies（P.Finch，1997）、Antibodies：A Practical Approach（D.Catty.，ed.，IRL Press，1988－1989）、Monoclonal Antibodies：A Practical Approach（P.Shepherd and C.Dean，eds.，Oxford University Press，2000）、Using Antibodies：A Laboratory Manual（E.Harlow and D.Lane，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1999）、The Antibodies（M.Zanetti and J.D.Capra，eds.，Harwood Academic Publishers，1995）、及びCancer：Principles and Practice of Oncology（V.T.DeVita et al.，eds.，J.B.Lippincott Company，2011）。

【００４０】

定義

本明細書を解釈する目的において、以下の定義が適用され、適当な場合はいつでも、単数形で使用される用語は複数形も含み、その逆も同様である。以下に記載されるいずれかの定義が、参照により本明細書に組み込まれるいずれかの文献と矛盾する場合には、以下に記載される定義が優先する。

【００４１】

本明細書で使用される単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、別途指示されない限り、複数の対象を含む。

【００４２】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態には「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ）」、及び「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」の態様及び実施形態があることがわかる。

【００４３】

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者であれば容易にわかるそれぞれの値の通常の誤差範囲を指している。本明細書において「約」がついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体に関する実施形態を含む（かつ説明している）。

【００４４】

本明細書で使用される「治療」とは、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本明細書で使用される「治療」とは、ヒトを含む哺乳動物の疾患に対する治療薬の投与または適用を包含する。本発明の目的において、有益なまたは所望の臨床結果には、１つ以上の症状の緩和、疾患の範囲の縮小、疾患の拡散（たとえば、転移、たとえば、肺またはリンパ節への転移）の防止または遅延、疾患の再発の防止または遅延、疾患の進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善、疾患または疾患の進行の抑制、疾患またはその進行の抑制または緩徐化、疾患の発症の阻止、及び寛解（部分的または全体的にかかわらず）のうちのいずれか１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。増殖性疾患の病理学的結果の軽減もまた「治療」に包含される。本発明の方法は、治療のこれらの態様のうちの１つ以上を意図している。

【００４５】

本明細書において使用される「予防的治療」という用語は、個人が疾患を有するかまたは疾患のリスクがあると知られているかまたは疑われているが、疾患の症状が全くないかまたは最小限の症状しかない場合の治療を指す。予防的治療を受けている個体は、症状が現れる前に治療を受けてもよい。いくつかの実施形態では、個体は、前癌病変を有する場合に、治療を受けてもよい。

【００４６】

本明細書において「併用療法」とは、第１の作用因子を別の作用因子と組み合わせて投与することを意味する。「組み合わせて」とは、ある治療モダリティを別の治療モダリティに加えて行うこと、たとえば、本明細書に記載されるＴＩＬ組成物の投与を本明細書に記載される免疫複合体の投与に加えて同じ個体に行うこと、を指す。したがって、「組み合わせて」とは、ある治療モダリティを、別の治療モダリティを行う前、行っている間、または行った後に、個体に対して行うことを指す。

【００４７】

本明細書で使用される「同時投与」という用語は、併用療法において第１治療剤と第２治療剤を、約１５分以内、たとえば、約１０分、５分、または１分以内の時間間隔で投与することを意味する。第１治療剤と第２治療剤を同時に投与する場合、第１治療剤と第２治療剤は同じ組成物（たとえば、第１治療剤と第２治療剤の両方を含む組成物）に含まれていてもよく、または別々の組成物（たとえば、第１治療剤が１つの組成物に含まれ、第２治療剤が別の組成物に含まれる）に含まれていてもよい。

【００４８】

本明細書において使用される「逐次投与」という用語は、併用療法において第１治療剤と第２治療剤を、約１５分以上、たとえば、約２０分、３０分、４０分、５０分、６０分のいずれか以上、またはそれ以上の時間間隔を空けて投与することを意味する。第１治療剤または第２治療剤のいずれを最初に投与してもよい。第１治療剤と第２治療剤が、別々の組成物に含まれている場合、それらは同じまたは異なるパッケージまたはキットに含まれていてもよい。

【００４９】

本明細書において使用される「併用投与」という用語は、併用療法において第１治療剤

の投与と第２治療剤の投与が互いに重なることを意味する。
【００５０】
がんに関して「治療」という用語には、がん細胞を殺すこと、がん細胞の増殖を阻害すること、がん細胞の複製を阻害すること、全体的な腫瘍量を低減すること、及び該疾患に関連する１つ以上の症状を改善することのいずれかまたはすべてが含まれる。
【００５１】
本明細書で使用される「細孔」という用語は、材料内の孔、裂け目、空洞、開口、破損、隙間、または穿孔を含むがこれらに限定されない開口部を指す。いくつかの例では（示されている場合）、この用語は、本開示の表面内の細孔を指す。他の例では（示されている場合）、細孔は細胞膜の孔を指す場合がある。
【００５２】
本明細書において使用される「膜」という用語は、細孔を有する選択的なバリアまたはシートを指す。この用語には、境界または裏地として機能する柔軟なシート状の構造物が含まれる。いくつかの例では、この用語は細孔を含む表面またはフィルターを指す。この用語は「細胞膜」という用語とは区別される。
【００５３】
本明細書で使用される「フィルター」という用語は、細孔を介する選択的通過を可能にする多孔質物品を指す。いくつかの例では、この用語は細孔を含む表面または膜を指す。
【００５４】
細胞に関連して抗原やアジュバントなどの因子に関して使用される「外因性」という用語は、ある因子が細胞外のものであること、またはある因子が細胞外から細胞内に送達されていることを指す。細胞には、該因子がすでに存在していてもよいし、存在していなくともよく、また、細胞は、外因性因子が送達された後に該因子を産生してもよいし、産生しなくともよい。
【００５５】
本明細書で使用される「不均質」という用語は、あるものが構造または組成について混ざり合っているか均一ではないことを指す。いくつかの例では、この用語は、細孔が特定の表面内でさまざまなサイズ、形状、または分布を有することを指す。
【００５６】
本明細書で使用される「均質」という用語は、あるものが構造または組成について全体にわたり一定または一様であることを指す。いくつかの例では、この用語は、細孔が特定の表面内で一定のサイズ、形状、または分布を有することを指す。
【００５７】
本明細書において使用される「相同」という用語は、ある分子が同じ生物に由来することを指す。いくつかの例では、この用語は、ある核酸またはタンパク質が特定の生物内で通常どおり存在しているか発現されていることを指す。
【００５８】
コード配列や制御配列などの核酸配列に関連して「異種」という用語は、配列が互いに通常どおりには結合されていないこと、及び／または、配列が特定の細胞に通常どおりには付随していないことを指す。したがって、核酸構築物またはベクターの「異種」領域とは、核酸のセグメントであって、天然では一緒に存在しない別の核酸分子内に存在するか、または天然では一緒に存在しない別の核酸分子に結合している核酸セグメントである。たとえば、核酸構築物の異種領域は、コード配列を含み得るが、該コード配列は、天然では該コード配列と一緒に存在していない配列によって挟まれているものである。異種コード配列のもう１つの例は、コード配列自体が天然には存在しない構築物（たとえば、天然遺伝子とは異なるコドンを持つ合成配列）である。同様に、細胞内に通常は存在しない構築物で形質転換された細胞は、本発明の目的においては異種とみなされる。対立遺伝子変異または自然に発生する突然変異事象は、ここで使用されるような異種ＤＮＡを生じさせない。
【００５９】

ペプチド配列やポリペプチド配列などのアミノ酸配列に関連して「異種」という用語は、配列が互いに通常どおりには結合されていないこと、及び／または、配列が特定の細胞に通常どおりには付随していないことを指す。したがって、ペプチド配列の「異種」領域とは、アミノ酸のセグメントであって、天然では一緒に存在していない別のアミノ酸分子内にあるか、または天然では一緒に存在していない別のアミノ酸分子に結合したアミノ酸のセグメントである。たとえば、ペプチド構築物の異種領域は、ペプチドのアミノ酸配列を含み得るが、該ペプチドのアミノ酸配列は、天然では該ペプチドのアミノ酸配列とは一緒に存在していない配列によって挟まれているものである。異種ペプチド配列のもう１つの例は、ペプチド配列自体が天然には存在しない構築物（たとえば、天然遺伝子にコードされるものとは異なるアミノ酸を有する合成配列）である。同様に、細胞内に通常は存在しないアミノ酸構築物を発現するベクターで形質転換された細胞は、本発明の目的においては異種とみなされる。対立遺伝子変異または自然に発生する突然変異事象は、ここで使用されるような異種ペプチドを生じさせない。

【００６０】

本明細書において使用される「阻害」という用語は、ある特定の標的の存在または作用を阻止し、低減し、排除し、さもなくば、ある特定の標的の存在または作用に拮抗する行為を指し得る。阻害は部分的阻害または完全阻害を指してもよい。たとえば、免疫反応を阻害することは、免疫反応の遮断、低下、排除、またはその他の拮抗作用につながるあらゆる行為を指し得る。他の例では、核酸の発現の阻害には、核酸の転写の低減、ｍＲＮＡ存在量の低減（たとえば、ｍＲＮＡ転写のサイレンシング）、ｍＲＮＡの分解、ｍＲＮＡ翻訳の阻害などが含まれるが、これらに限定されない。別の例では、阻害は、増殖を遅らせたり止めたりする行為、たとえば、腫瘍細胞の増殖を遅らせたり阻止したりすることを指し得る。

【００６１】

本明細書で使用される「抑制」という用語は、ある特定の標的の存在または作用を減少させる、低下させる、妨害する、制限する、小さくする、またはその他の態様で減らす行為を指し得る。抑制は部分的抑制または完全な抑制を指してもよい。たとえば、免疫反応を抑制するということは、免疫反応を減少させる、低下させる、妨害する、制限する、小さくする、またはその他の態様で減らすことにつながるあらゆる行為を指し得る。他の例では、核酸の発現の抑制には、核酸の転写の低減、ｍＲＮＡ存在量の低減（たとえば、ｍＲＮＡ転写のサイレンシング）、ｍＲＮＡの分解、ｍＲＮＡ翻訳の阻害などが含まれるが、これらに限定されない。

【００６２】

本明細書で使用される「増強」という用語は、ある特定の標的の存在または作用を向上させる、促進する、高める、またはその他の態様で増加させる行為を指し得る。たとえば、免疫反応を増強することは、免疫反応を向上させる、促進する、高める、またはその他の態様で増加させることにつながるあらゆる行為を指し得る。一例では、免疫反応を増強することは、抗原及び／またはアジュバントを使用して免疫反応を向上させる、促進する、高める、またはその他の態様で増加させることを指し得る。他の例では、核酸の発現の増強は、核酸の転写の増加、ｍＲＮＡ存在量の増加（たとえば、ｍＲＮＡ転写の増加）、ｍＲＮＡ分解の減少、ｍＲＮＡ翻訳の増加などを含み得るが、これらに限定されない。本開示の改変されたＴＩＬを説明するために本明細書で使用される用語は、いくつかの態様において、改変されていない対応するＴＩＬよりも、改変されたＴＩＬの１つ以上の特性が向上または増加していることを指し得る。このような特性の非限定的な例は、本開示の全体にわたって示されている。

【００６３】

本明細書で使用される「調節」という用語は、特定の標的の存在または作用を変える、変更する、異ならせる、またはその他の態様で改変する行為を指し得る。たとえば、免疫反応を調節することは、免疫反応を変える、変更する、異ならせる、またはその他の態様で改変することにつながるあらゆる行為を指し得る。いくつかの例では、「調節」は、特

定の標的の存在または作用を増強することを指す。いくつかの例では、「調節」は、特定の標的の存在または作用を抑制することを指す。他の例では、核酸の発現の調節には、核酸の転写の変化、ｍＲＮＡ存在量の変化（たとえば、ｍＲＮＡ転写の増加）、ｍＲＮＡ分解の対応する変化、ｍＲＮＡ翻訳の変化などが含まれるが、これらに限定されない。

【００６４】

本明細書で使用される「誘導」という用語は、ある結果を引き起こす、促進する、刺激する、確立する、または他の態様でもたらす行為を指し得る。たとえば、免疫反応を誘導することは、所望の免疫反応を引き起こす、促進する、刺激する、確立する、または他の態様でもたらすことにつながるあらゆる行為を指し得る。他の例では、核酸の発現を誘導することは、核酸の転写の開始、ｍＲＮＡ翻訳の開始などを含み得るが、これらに限定されない。

【００６５】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、ヌクレオチド、すなわちリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さの重合体を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のＤＮＡまたはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、またはプリン塩基及びピリミジン塩基を含むポリマー、またはその他の天然のヌクレオチド塩基、化学的または生化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化されたヌクレオチド塩基が含まれるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドの主鎖は、糖及びリン酸基（典型的にはＲＮＡまたはＤＮＡに存在し得る）で構成することができ、あるいは、修飾または置換された糖またはリン酸基で構成することができる。代替的に、ポリヌクレオチドの主鎖は、ホスホルアミダート及びホスホロチオエートなどの合成サブユニットのポリマーで構成することができ、したがって、オリゴデオキシヌクレオシドホスホルアミダート（Ｐ－ＮＨ２）、混合ホスホロチオエート－ホスホジエステルオリゴマー、または混合ホスホルアミダート－ホスホジエステルオリゴマーであってもよい。さらに、二本鎖ポリヌクレオチドは、相補鎖を合成し適切な条件下で鎖をアニーリングするか、または適切なプライマーを用いてＤＮＡポリメラーゼにより相補鎖を新規に合成することにより、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。

【００６６】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すため同義的に使用され、最小限の長さに限定されるものではない。このようなアミノ酸残基のポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含むことができ、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体、及び多量体を含むが、これらに限定されない。この定義には、完全長タンパク質とその断片の両方が含まれる。これらの用語には、ポリペプチドの発現後の修飾、たとえば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含まれる。さらに、本発明の目的において「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、本来の配列に対する改変（たとえば、欠失、付加、及び置換（一般に性質は保存される））を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的突然変異誘発などによる意図的なものであってもよく、タンパク質を生成する宿主の突然変異やＰＣＲ増幅によるエラーなどによる偶発的なものであってもよい。

【００６７】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」または「薬理学的に適合する」とは、ある材料が生物学的にまたは他の態様で望ましくないものではないことを意味し、たとえば、当該材料は、患者に投与される医薬組成物に、顕著な望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、または、それが含まれる組成物の他の成分と有害な態様で相互作用することなく、組み込むことができる。薬学的に許容される担体または添加剤は、毒性試験及び製造試験の必要な基準を満たしていることが好ましく、及び／または、米国食品医薬品局が作成したＩｎａｃｔｉｖｅ　Ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔ　Ｇｕｉｄｅに記載されていることが好ましい。

【００６８】

本明細書で使用される「マイクロ流体システム」とは、少容量の液体を個別に処理するため少容量（たとえば、ｍ＼Ｌ、ｎＬ、ｐＬ、ｆＬ）の流体を処理するシステムを指す。本明細書に記載される特定の実装形態には、多重化、自動化、及びハイスループットスクリーニングが含まれる。流体（たとえば、緩衝液、溶液、ペイロードを含む溶液、または細胞懸濁液）は、移動させ、混合し、分離し、あるいは他の態様で処理することができる。本明細書に記載の特定の実施形態では、マイクロ流体システムを使用して、緩衝液中に懸濁された細胞を機械的に狭窄させて、細胞に摂動（たとえば、孔）を誘発し、ペイロードまたは化合物が細胞の細胞質ゾルに入ることを可能にする。

【００６９】

本明細書に記載された構造的特性及び機能的特性のいずれについても、それらの特性を決定する方法は当該技術分野で知られている。

【００７０】

腫瘍浸潤リンパ球の活性及び／または増殖を増強する方法

Ｔ細胞の活性化により細胞内シグナル伝達カスケードが開始され、ＴＣＲシグナルと関連シグナルの強度に応じて、最終的に増殖、エフェクター機能、または死をもたらす。早すぎる活性化や過剰な活性化を防ぐために、Ｔ細胞は完全な活性化のために２つの独立したシグナルを必要とする。シグナル１は、ＭＨＣと複合した抗原ペプチドへのＴＣＲの結合によってもたらされる抗原特異的シグナルである。シグナル２は、サイトカインによって媒介されるかまたは抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のＢ７．１（ＣＤ８０）やＢ７．２（ＣＤ８６）などの共刺激分子の関与によって媒介される。シグナル３は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、及びＩＦＮ－αなどの炎症性サイトカインによって媒介される。

【００７１】

本明細書で使用される「腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）」という用語は、腫瘍組織に侵入したリンパ球細胞集団のいずれかまたはすべてを含み得る。ＴＩＬは、乳癌を含む多くの固形腫瘍で報告されており、治療の有効性と成果を予測する上で重要なバイオマーカーであることが明らかになってきている。乳癌では、ＴＩＬは主に細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＤ８＋）及びヘルパーＴ細胞（ＣＤ４＋）で構成され、Ｂ－細胞及びＮＫ細胞の割合は少ないと考えられる（Ｐｒｕｎｅｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｅａｓｔ．２０１８ Ｆｅｂ；３７：２０７－２１４、Ｗｈｉｔｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ，１９９２；２８（２－３）：３５０－６）。ＴＩＬの数が多いことは、腫瘍内の三次リンパ様構造の存在と相関関係があり、そこにはさらにリンパ球生成を担う濾胞性ヘルパーＴ細胞（Ｔｆｈ）も存在している（Ｇｕ－Ｔｒａｎｔｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，２０１３ Ｊｕｌ；１２３（７）：２８７３－９２）。

【００７２】

ＴＩＬは、腫瘍抗原に対する特異性が高いため、治療に有用である。治療目的で、酵素による消化を含むがこれに限定されない１つ以上の方法によって、ＴＩＬを腫瘍組織から分離することができる。腫瘍から分離した後、場合によりＴＩＬのサブセットを分離して、部分集団の純度を高めることができる。その後、ＴＩＬを、１段階または複数の段階で増殖させることができる（Ｄｕｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３；２６（４）：３３２－３４２、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２ Ａｐｒ；３５（３）：２８３－２９２）。いくつかの例では、ＴＩＬを、数千個の細胞から数十億個の細胞にまで増殖させることができる。増殖したＴＩＬを個体に注入して、１つまたは複数の腫瘍を治療することができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは個体に対して自己由来である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは個体に対して同種異系である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬを、機械的分離、酵素による分離、及び／または密度勾配遠心法によって癌腫から分離してもよい（Ｂａｌｄａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ２０１５ Ａｐｒ ２８；１１２（９）：１５１０－８、Ｔａｎ ａｎｄ Ｌｅｉ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１９；１９６０：９３－９９）。

【００７４】
腫瘍浸潤リンパ球の活性及び／または増殖を増強する方法
いくつかの態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変してシグナル２及び／またはシグナル３のメディエーターの１つ以上の発現が増加するようする。
【００７５】
いくつかの態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの態様では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子の発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、共刺激分子は、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である。いくつかの実施形態では、共刺激分子はＣＤ８６である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬを改変してＢ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２のうちの１つ以上の発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、ＴＩＬを改変してＣＤ８６の発現が増加するようにする。
【００７６】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、ＴＩＬにおいて共刺激分子をコードする核酸を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２のうちの１つ以上をコードする１つ以上の核酸を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、ＣＤ８６をコードする１つ以上の核酸を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、共刺激分子をコードする核酸はｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＣＤ８６をコードする核酸はｍＲＮＡである。したがって、いくつかの態様では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子の発現が増加するようにすることは、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸（たとえば、ｍＲＮＡ）をＴＩＬに細胞内送達することを含む。
【００７７】
いくつかの態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの態様では、該方法は、ＴＩＬを改変して、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも、１つ以上の共刺激分子の発現が増加するようにすることを含む。いくつかの態様では、該方法は、ＴＩＬを改変して、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも、１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにすることを含む。いくつかの態様では、該方法は、ＴＩＬを改変して、参照ＴＩＬ（たとえば、本明細書に記載の改変を受けていない対応するＴＩＬ）よりも、１つ以上のサイトカインと１つ以上の共刺激分子の両方の発現が増加するようにすることを含む。
【００７８】
いくつかの態様では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、ＴＩＬを改変して１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｉ型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、２型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－α、もしくはＩＬ－２１、

またはそれらの機能的変異体のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体及び／またはＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である。本明細書において使用される「機能的変異体」という用語は、ポリペプチドまたはタンパク質（たとえば、サイトカイン）の変異体であって、当該ポリペプチドまたはタンパク質と実質的なまたは有意な配列同一性を有し、かつ当該ポリペプチドまたはタンパク質の生物学的活性の少なくとも１つを保持する変異体を指す。ポリペプチドまたはタンパク質の機能的変異体は、本開示を考慮して、当該技術分野で既知の手段により調製することができる。機能的変異体は、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列に対する１つ以上の改変を含み得る。いくつかの態様では、改変は、たとえば、ポリペプチドまたはタンパク質の熱安定性の改善、基質特異性の変更、最適ｐＨの変更、免疫原性の低減などにより、該ポリペプチドまたはタンパク質の１つ以上の物理化学的特性を変化させるものである。いくつかの態様では、改変は、ポリペプチドまたはタンパク質の生物学的活性のすべてを破壊または除去しない限り、該ポリペプチドまたはタンパク質の生物学的活性の１つ以上を変化させるものである。

【００７９】

いくつかの態様では、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、ＴＩＬにおいて膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、ＴＩＬにおいて膜結合型キメラサイトカインの１つ以上をコードする１つ以上の核酸を発現させることを含み、ここでサイトカインはＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－α、またはＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、該方法は、ＴＩＬにおいて膜結合型キメラサイトカインをコードする１つ以上の核酸を発現させることを含み、ここでサイトカインはＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする１つ以上のｍＲＮＡは、ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡである。

【００８０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬを改変して１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１、またはそれらの機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＦＮ－α２またはその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、膜結合型キメラサイトカインなどの変異型サイトカイン（改変型サイトカインなど）である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬを改変して１つ以上の膜結合型キメラサイトカイン（膜結合型ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１など）の発現が増加するようにする。

【００８１】

いくつかの実施形態では、サイトカインは改変されており、該改変されたサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインはペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、トランスフェリン受容体タンパク質１（ＴＦＲＣ）または腫瘍壊死因子（たとえば、ＦａｓＬ）膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１１または配列番号１２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、G_4SリンカーまたはＥＡＡＡＫリンカーである。実施形態では、G_4Sリンカーは、G_4S配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ＥＡＡＡＫリンカーは、ＥＡＡＫ配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは$(G_4S)_3$（配列番号３）または$(EAAAK)_3$（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む。いくつかの

実施形態では、ＴＩＬを改変して１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらす核酸を含むようにする。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、配列番号１または２のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｔ細胞活性化を刺激するシグナル３エフェクターである。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、非膜結合型サイトカインよりも、個体におけるサイトカインの半減期が長い。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインの半減期は、非膜結合型サイトカインよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中の膜結合型サイトカインは、抗原提示細胞により提示される抗原とサイトカインとの空間的結合が、非膜結合型サイトカインを含むＴＩＬよりも、約１、２、３、４、６、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４８、７２、９６時間以上のいずれか１つの時間長くなっている。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインを含むＴＩＬは、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で高い局所サイトカイン濃度を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは膜結合型ケモカインである。

【００８２】

いくつかの態様では、ＴＩＬの活性を増強する組成物を提供し、該組成物はＴＩＬ中に膜結合型キメラサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは改変されており、該改変されたサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインはペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、トランスフェリン受容体タンパク質１（ＴＦＲＣ）または腫瘍壊死因子（たとえば、ＦａｓＬ）膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１１または配列番号１２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、G_4SリンカーまたはＥＡＡＡＫリンカーである。実施形態では、G_4Sリンカーは、G_4S配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ＥＡＡＡＫリンカーは、ＥＡＡＡＫ配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは$(G_4S)_3$（配列番号３）または$(EAAAK)_3$（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらす核酸を含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、配列番号１または２のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらすｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｔ細胞の活性化を刺激するシグナル３エフェクターである。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、非膜結合型サイトカインよりも、個体におけるサイトカインの半減期が長い。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインの半減期は、非膜結合型サイトカインよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型キメラサイトカインが導入されたＴＩＬによって提示される抗原とサイトカインとの空間的結合が、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１、２、３、４、６、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４８、７２、９６時間以上のいずれか１つの時間長くなっている。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインを含むＴＩＬは、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２

５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で高い局所サイトカイン濃度を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは膜結合型ケモカインである。

【００８３】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、該ＴＩＬを、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変する。いくつかの実施形態では、サイトカインをコードする核酸及び／または共刺激分子をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【００８４】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法では、該ＴＩＬを、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートし、摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変する。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインをコードする核酸はｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【００８５】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。本明細書で使用される「インキュベート」という用語は、少なくとも第１の成

分（たとえば、サイトカインをコードする核酸）と第２の成分（たとえば、ＴＩＬ）とを一緒にして、第１の成分と第２の成分とが物理的に近接し、したがって相互作用（すなわち接触）できるようにすることを包含する。

【００８６】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法を提供し、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【００８７】

本明細書に記載された方法のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、ＴＩＬは哺乳動物のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、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ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは霊長類のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬはヒトのＴＩＬである。

【００８８】

活性及び／または増殖が増強された改変されたＴＩＬの組成物

いくつかの態様では、活性及び／または増殖能が増強された改変されたＴＩＬを含む組成物を提供する。

【００８９】

いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、シグナル２メディエーター及び／またはシグナル３メディエーターの１つ以上の発現が増加するように改変されている。

【００９０】

いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている。いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子の発現が増加するように改変されている。いくつかの実施形態では、共刺激分子は、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である。いくつかの実施形態では、共刺激分子はＣＤ８６である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２のうちの１つ以上の発現が増加するように改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＣＤ８６の発現が増加するように改変されている。

【００９１】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、ＴＩＬ中で共刺激分子をコードする核酸を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、Ｏ

ＸＡＯＬ、ＴＬＡ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤＯＬ、ＴＩＭＡ、ＳＬＡＭ、ＣＤＨ、ＣＤＢＢＢＡ、またはＣＤＢＢＡのうちの１つ以上をコードする１つ以上の核酸を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＣＤＦをコードする１つ以上の核酸を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、核酸の１つ以上はｍＲＮＡである。

【００９２】

いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている。いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｉ型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、２型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－α、もしくはＩＬ－２１、またはそれらの機能的変異体のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体及び／またはＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である。

【００９３】

いくつかの態様では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、ＴＩＬ中で膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、該ＴＩＬは、ＴＩＬ中で膜結合型キメラサイトカインの１つ以上をコードする１つ以上の核酸を発現するように改変されており、ここで該サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＦＮ－α、またはＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、該ＴＩＬは、ＴＩＬ中で膜結合型キメラサイトカインをコードする１つ以上の核酸を発現するように改変されており、ここで該サイトカインはＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、核酸の１つ以上はｍＲＮＡである。

【００９４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１、またはそれらの機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＦＮ－α２またはその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、膜結合型キメラサイトカインなどの変異型サイトカイン（改変型サイトカインなど）である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上の膜結合型キメラサイトカイン（膜結合型ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１など）の発現が増加するように改変されている。

【００９５】

いくつかの実施形態では、サイトカインは改変されており、該改変されたサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインはペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、トランスフェリン受容体タンパク質１（ＴＦＲＣ）または腫瘍壊死因子（たとえば、ＦａｓＬ）膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１１または配列番号１２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、G_4SリンカーまたはＥＡＡＡＫリンカーである。実施形態では、G_4Sリンカーは、G_4S配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ＥＡＡＡＫリンカーは、ＥＡＡＡＫ配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは$(G_4S)_3$（配列番号３）または$(EAAAK)_3$（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む。いくつか

の実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらす核酸を含むように改変されている。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、配列番号１または２のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらすｍＲＮＡを含むよう改変されている。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｔ細胞の活性化を刺激するシグナル３エフェクターである。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、非膜結合型サイトカインよりも、個体におけるサイトカインの半減期が長い。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインの半減期は、非膜結合型サイトカインよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中の膜結合型サイトカインは、抗原提示細胞により提示される抗原とサイトカインとの空間的結合が、非膜結合型サイトカインを含むＴＩＬよりも、約１、２、３、４、６、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４８、７２、９６時間以上のいずれか１つの時間長くなっている。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインを含むＴＩＬは、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で高い局所サイトカイン濃度を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは膜結合型ケモカインである。

【００９６】

いくつかの態様では、ＴＩＬの活性を増強する組成物を提供し、該組成物はＴＩＬ中に膜結合型キメラサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは改変されており、該改変されたサイトカインは、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインはペプチドリンカーによって膜貫通ドメインに結合されている。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、トランスフェリン受容体タンパク質１（ＴＦＲＣ）または腫瘍壊死因子（たとえば、ＦａｓＬ）膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号１１または配列番号１２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、G_4SリンカーまたはＥＡＡＡＫリンカーである。実施形態では、G_4Sリンカーは、G_4S配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ＥＡＡＡＫリンカーは、ＥＡＡＡＫ配列の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回の繰り返しのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは$(G_4S)_3$（配列番号３）または$(EAAAK)_3$（配列番号４）である。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、配列番号７～１０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現及び／または分泌の増加をもたらす核酸を含む。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、配列番号１または２のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、Ｔ細胞活性化を刺激するシグナル３エフェクターである。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインは、非膜結合型サイトカインよりも、個体におけるサイトカインの半減期が長い。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインの半減期は、非膜結合型サイトカインよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍、または５００倍以上のいずれか１つの率で増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型キメラサイトカインが導入されたＴＩＬによって提示される抗原とサイトカインとの空間的結合が、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１、２、３、４、６、８、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４８、７２、９６時間以上のいずれか１つの時間長くなっている。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインを含むＴＩＬは、非膜結合型サイトカインを含む対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、１００倍、２００倍

、または５００倍以上のいずれか１つの率で高い局所サイトカイン濃度を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは膜結合型ケモカインである。

【００９７】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変されている。いくつかの実施形態では、サイトカインをコードする核酸及び／または共刺激分子をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【００９８】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして摂動された投入したＴＩＬに入りこませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変されている。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインをコードする核酸はｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【００９９】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物においてＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【０１００】

いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬを含む組成物を提供し、該組成物において

ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを膜結合型キメラサイトカイン及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させる前に、ＴＩＬを、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸及び１つ以上の共刺激分子をコードする核酸と共にインキュベートすることを含む方法で改変されている。いくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【０１０１】

本明細書に記載された組成物のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、ＴＩＬは哺乳動物のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、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ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは霊長類のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬはヒトのＴＩＬである。

【０１０２】

治療方法、医薬として使用するための組成物、及び医薬の製造における医薬組成物の使用

いくつかの態様では、個体における免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現の増加を示す改変されたＴＩＬを投与することを含む。たとえば、いくつかの態様では、本開示は、免疫反応の調節を必要とする個体において免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、１つ以上のサイトカインの発現の増加を示す改変されたＴＩＬを対象に投与することを含む。いくつかの態様では、本開示は、免疫反応の調節を必要とする個体において免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、１つ以上の共刺激分子の発現の増加を示す改変されたＴＩＬを対象に投与することを含む。いくつかの態様では、本明細書では、免疫反応の調節を必要とする個体において免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、（ｉ）１つ以上のサイトカインと（ｉｉ）１つ以上の共刺激分子の両方の発現の増加を示す改変されたＴＩＬを対象に投与することを含む。いくつかの態様では、改変されたＴＩＬは、本明細書に記載される方法のいずれか１つに従って調製される。いくつかの態様では、個体において免疫反応を調節する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つを投与することを含む。

【０１０３】

いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の方法のいずれか１つに従って調製された改変されたＴＩＬを投与することを含む。いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つを投与することを含む。したがって、本開示のいくつかの態様は、がん治療を必要とする対象においてがんを治療する方法に関し、該方法は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬのいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの態様では、感染症の治療を必要とする対象において感染症を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬのいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの態様では、ウイルス関連疾患の治療を必要とする対象においてウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬのいずれかを対象に投与することを含む。本開示によって治療できるがん、感染症、及びウイルス関連疾患の非限定的な例は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、該方法は、改変されたＴＩＬを複数回投与すること、または改変されたＴＩＬを含む組成物を複数回投与することを含む。本開示から明らかなように、改変されたＴＩＬ（または改変されたＴＩＬを含む組成物）は、任意の適切な投与経路により対象に投与することができる。このような投与経路の非限定的な例としては、腫瘍内、経口、肺内、鼻腔内、非経口（静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下）、直腸内、リンパ内、髄腔内、眼周囲、または局所が挙げられる。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬまたは改変されたＴＩＬを含む組成物を、静脈内または腫瘍内に投与する。いくつかの実施形態では、個体は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、個体は、サル、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、またはウサギである。いくつかの実施形態では、個体は霊長類である。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬまたは改変されたＴＩＬを含む組成物を、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与する。いくつかの実施形態において、別の治療剤は、チェックポイント治療剤である。

【０１０５】

いくつかの態様では、個体において免疫反応を刺激するための医薬組成物を提供し、該組成物は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つの有効量を含む。いくつかの態様では、医薬として使用するための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つの有効量を含む。

【０１０６】

いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つの有効量を含む。

【０１０７】

いくつかの態様では、個体において免疫反応を刺激するための医薬の製造における医薬組成物の使用を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つの有効量を含む。

【０１０８】

いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬の製造における医薬組成物の使用を提供し、該医薬組成物は、本明細書に記載の改変されたＴＩＬを含む組成物のいずれか１つの有効量を含む。

【０１０９】

いくつかの態様では、医薬として使用するための組成物を提供し、該組成物は、膜結合型キメラサイトカインを含む改変されたＴＩＬの有効量を含む。いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を組成物で治療するための組成物を提供し、該組成物は、膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬの有効量を含む。いくつかの態様では、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法を提供し、該方法は、膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬの有効量を含む組成物を個体に投与することを含む。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、個体において免疫反応を刺激するための医薬及び／または個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬の製造における膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬの有効量を含む組成物の使用を提供する。

【０１１１】

本明細書に記載の医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従いいくつかの実施形態では、組成物は複数回投与用に処方されている。いくつかの実施形態では、組成物を静脈内または腫瘍内に投与する。いくつかの実施形態では、個体は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、個体は、サル、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、またはウサギである。いくつかの実施形態では、個体は霊長類である。いくつかの実施形態では、個体はヒトである。いくつかの実施形態では、組成物は、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与されるように処方されている。

いくつかの実施形態では、別の治療剤は、チェックポイント治療剤である。

【０１１２】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変されている。いくつかの実施形態では、サイトカインをコードする核酸及び／または共刺激分子をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【０１１３】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸と共にインキュベートして摂動された投入したＴＩＬに入りこませて、該核酸を発現させ、それによって、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子を含む改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって改変されている。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインをコードする核酸はｍＲＮＡである。サイトカインが膜結合型サイトカインであるいくつかの実施形態では、膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸は、膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである。

【０１１４】

ＴＩＬの活性及び増殖能の調節

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。

【０１１５】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。

【０１１６】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性

サイトカインの非存在下で、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。

【０１１７】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で、改変されていない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。

【０１１８】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日のいずれかの日数培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い生体内持続性を示す。

【０１１９】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日のいずれかの日数培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも長い生体内循環時間を示す。

【０１２０】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、セントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカー（たとえば、ＣＤ６２Ｌであるがこれに限定されない）の発現が増加している。本明細書において使用される「セントラルメモリーＴ細胞」または「T_{CM}細胞」という用語は、少なくともＣＤ４５ＲＯ、ＣＣＲ７、ＣＤ６２Ｌ、及び／またはＣＤ１２７を発現するメモリーＴ細胞を指す。したがって、いくつかの態様では、記載されたＴＩＬを改変する方法は、ＴＩＬで１つ以上のセントラルメモリーＴ細胞マーカーの発現を増加させるのに有用である。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、セントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカーの発現が増加している。

【０１２１】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、セントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカーの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、セントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカーの発現が増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、セントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカーの発現

が増加している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１２２】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるセントラルメモリーＴ細胞の１つ以上のマーカーの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超のいずれか１つの率で増加している。

【０１２３】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己再生の１つ以上のマーカー（たとえば、ＴＣＦ１であるがこれに限定されない）の発現が増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己再生の１つ以上のマーカーの発現が増加している。

【０１２４】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己再生の１つ以上のマーカーの発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己再生の１つ以上のマーカーの発現が増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己再生の１つ以上のマーカーの発現が増加している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１２５】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ細胞自己再生の１つ以上のマーカーの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超のいずれか１つの率で増加している。

【０１２６】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞枯渇の１つ以上のマーカー（たとえば、ＣＤ３９またはＣＤ６９であるがこれに限定されない）の発現が減少している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞自己枯渇の１つ以上のマーカーの発現が減少している。枯渇マーカーの非限定的な例としては、ＰＤ－１、ＣＤ３９、ＴＩＭ－３、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＬＡＧ－３が挙げられる。

【０１２７】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞枯渇の１つ以上のマーカーの発現が減少している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞枯渇の１つ以上

のマーカーの発現が減少している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ細胞枯渇の１つ以上のマーカーの発現が減少している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１２８】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ細胞枯渇の１つ以上のマーカーの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超のいずれか１つの率で減少している。

【０１２９】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。

【０１３０】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１３１】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、ＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超のいずれか１つの率で増加している。

【０１３２】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が減少している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が減少している。

【０１３３】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、Ｃ

Ｄ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が減少している。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が減少している。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が減少している。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１３４】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＣＤ３９、及びＣＤ６９のうちの１つ以上の発現が、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍未満のいずれか１つの率で減少している。

【０１３５】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。

【０１３６】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２であるが、これに限定されない）を含まない培地で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２であるが、これに限定されない）を含まない培地で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれか１つの日数培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２であるが、これに限定されない）を含まない培地で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１３７】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬの増殖率は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超のいずれか１つの率で増加している。

【０１３８】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、腫瘍細胞と共培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。

【０１３９】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であるが、これに限定されない）の非存在下で腫

瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であるが、これに限定されない）の非存在下で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間のいずれかの日数、腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカイン（たとえば、外因性ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であるが、これに限定されない）の非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。

【０１４０】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬの増殖率は、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養した場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、１０倍、２０倍、５０倍、または１００倍以上のいずれか１つの率で増加している。

【０１４１】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。

【０１４２】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。

【０１４３】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は自己腫瘍細胞である。

【０１４４】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにおけるグランザイムＢの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、１０倍、２０倍、５０倍、または１００倍以上のいずれか１つの率で増加している。

【０１４５】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、改変されていない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。いくつかの実施形態

では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。

【０１４６】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、外因性サイトカインの非存在下で培養した場合、改変されていない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、外因性サイトカインの非存在下で培養した場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。

【０１４７】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養した場合、改変されていない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養した場合、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬ中の百分率よりも高い。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は自己腫瘍細胞である。

【０１４８】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬ中のグランザイムＢを発現する細胞の百分率は、改変されていない対応するＴＩＬ中の百分率よりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、１０倍、２０倍、５０倍、または１００倍超のいずれか１つの率で高い。

【０１４９】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも多く共培養した腫瘍細胞を死滅させる。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも多く共培養した腫瘍細胞を死滅させる。

【０１５０】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも多く、外因性サイトカインの非存在下で共培養した腫瘍細胞を死滅させる。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現する改変されたＴＩＬは、膜結合型ＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２を発現しない対応するＴＩＬよりも多く、外因性サイトカインの非存在下で共培養した腫瘍細胞を死滅させる。

【０１５１】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬにより共培養において促進された腫瘍細胞の死滅は、改変されていない対応するＴＩＬによるものよりも、約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、１０倍、２０倍、５０倍、または１００倍以上のいずれか１つの率で増加している。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は自己腫瘍細胞である。

【０１５２】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、外因性サイトカインの非存在下で共培養した腫瘍細胞の改変されたＴＩＬによる死滅は、１つ以上の外因性サイトカインの存在下で共培養した腫

瘍細胞の改変されていない対応するＴＩＬによる死滅と同等である。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－１２を含む。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２及び／または外因性ＩＬ－１２を含む。

【０１５３】

上述の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用のいずれか１つに従ういくつかの実施形態では、改変されたＴＩＬによって促進される共培養した腫瘍細胞の死滅は、１つ以上の外因性サイトカインの存在下で改変されていない対応するＴＩＬによって促進される腫瘍細胞の死滅に対して、１％、２％、５％、８％、１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、１．２倍、１．５倍、１．８倍、または２倍のいずれか１つの率以下でしか異ならない。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは外因性ＩＬ－２及び／または外因性ＩＬ－１２を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は自己腫瘍細胞である。

【０１５４】

本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用のための組成物、または使用に従ういくつかの実施形態では、膜結合型キメラＩＬ－２及び／または膜結合型キメラＩＬ－１２を含むＴＩＬは、ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、膜結合型キメラＩＬ－２及び／または膜結合型キメラＩＬ－１２をコードする核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで狭窄部の直径は懸濁液中の投入したＴＩＬの直径の関数であり、ｂ）摂動された投入したＴＩＬを、膜結合型キメラＩＬ－２及び／または膜結合型キメラＩＬ－１２をコードする核酸と共にインキュベートして、該核酸を摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、膜結合型キメラＩＬ－２及び／または膜結合型キメラＩＬ－１２をコードする核酸を発現させ、それによって、膜結合型キメラＩＬ－２及び／また膜結合型キメラＩＬ－１２を含むＴＩＬを生成させることと、により調製されるものである。

【０１５５】

狭窄部による送達

本明細書に記載し、説明するように、本明細書に示すＴＩＬを改変する方法は、ＴＩＬ（たとえば、ＴＩＬを含む細胞懸濁液）を細胞変形用狭窄部に通過させることを含み、これによりＴＩＬに摂動が生じ、その結果、サイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が、ＴＩＬと接触させられると、摂動部を通ってＴＩＬに入る。本明細書で使用される「摂動部」とは、細胞膜（たとえば、ＴＩＬの細胞膜）にできた、通常の定常状態条件下（たとえば、細胞に変形力が加えられていない条件下）では存在しない任意の開口部を指す。摂動部には、孔、裂け目、空洞、開口、細孔、破れ、隙間、穿孔、またはそれらの組み合わせが含まれる。本明細書に記載するように、細胞が狭窄部（本開示のものなど）を通過すると、細胞は、圧迫する物理的環境によるさまざまな力（機械的変形力及び／またはせん断力があるが、これらに限定されない）を受け、これが細胞膜に摂動部を生じさせる。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９０％、約１０％～約８０％、約１０％～約７０％、約２０％～約６０％、約４０％～約６０％、約３０％～約４５％、約５０％～約９９％、約５０％～約９０％、約５０％～約８０％、約５０％～約７０％、約６０％～約９０％、約６０％～約８０％、または約６０％～約７０％のいずれか１つである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約５μｍ～約１２μｍ、約６μｍ～約１２μｍ、約８μｍ～約１１μｍ、約９μｍ～約１１μｍ、約９．５μｍ～約１０．５μｍ、約８μｍ～約１５μｍ、約１０μｍ～約１５μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約１０μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約６μｍである。いく

つかの実施形態では、狭窄部の幅は約４．２μｍ～約６μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４．２μｍ～約４．８μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約３．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．５μｍ～約４μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４μｍ～約４．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．２μｍ～約３．８μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．８μｍ～約４．３μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約２μｍ、２．５μｍ、３μｍ、３．５μｍ、４μｍ、４．５μｍ、５μｍ、５．５μｍ、６μｍ、６．５μｍ、７μｍ、７．５μｍ、８μｍ、８．５μｍ、９μｍ、９．５μｍ、１０μｍ、１０．５μｍ、１１μｍ、１１．５μｍ、１２μｍ、１２．５μｍ、１３μｍ、１３．５μｍ、１４μｍ、１４．５μｍまたは１５μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約３．０μｍ、３．１μｍ、３．２μｍ、３．３μｍ、３．４μｍ、３．５μｍ、３．６μｍ、３．７μｍ、３．８μｍ、３．９μｍ、４．０μｍ、４．１μｍ、４．２μｍ、４．３μｍ、４．４μｍ、４．５μｍ、４．６μｍ、４．７μｍ、４．８μｍ、４．９μｍ、または５．０μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４μｍである。いくつかの実施形態では、投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を、複数の狭窄部に通過させ、ここで複数の狭窄部は、直列及び／または並列に配置されている。

【０１５７】

共刺激分子及び／またはサイトカインを含むＴＩＬの組成物の生成に使用される狭窄部

いくつかの実施形態では、本発明は、共刺激分子またはサイトカインを含むＴＩＬの組成物を提供する。いくつかの実施形態では、共刺激分子及び／またはサイトカインをコードする核酸を、ＴＩＬに細胞内送達する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、核酸をＴＩＬに導入するにあたり、該細胞を狭窄部に通すことによって一時的な孔を細胞の膜に発生させ、それによって核酸を細胞内に入り込ませる。狭窄部を用いて化合物を細胞内へ送達する例は、ＷＯ２０１３／０５９３４３、ＷＯ２０１５／０２３９８２、ＷＯ２０１６／０７０１３６、ＷＯ２０１７０４１０５０、ＷＯ２０１７００８０６３、ＷＯ２０１７／１９２７８５、ＷＯ２０１７／１９２７８６、ＷＯ２０１９／１７８００５、ＷＯ２０１９／１７８００６、ＷＯ２０２０／０７２８３３、ＷＯ２０２０１５４６９６、及びＷＯ２０２０１７６７８９に示されている。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、核酸をＴＩＬ中に送達して本発明のＴＩＬを作製するにあたり、ＴＩＬを含む細胞懸濁液を狭窄部に通すことによって、狭窄部が細胞を変形させて細胞に摂動を生じさせ、それにより核酸が細胞に入り込み、核酸は発現される。いくつかの実施形態では、狭窄部はマイクロ流体流路内に含まれる。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流路内に複数の狭窄部を並列及び／または直列に配置することができる。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体流路内の狭窄部は、入口部、中心部、及び出口部を有する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流路内の狭窄部の長さ、深さ、及び幅はさまざまであり得る。いくつかの実施形態では、マイクロ流体流路内の狭窄部の幅は、ＴＩＬの直径の関数である。ＴＩＬの直径を決定する方法は、当該技術分野で既知であり、たとえば、ハイコンテントイメージング、細胞計数装置、またはフローサイトメトリーがある。

【０１６１】

狭窄部を用いて共刺激分子またはサイトカインをコードする核酸をＴＩＬに送達するいくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約２μｍ～約１５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約１０μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約６μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４．２μｍ～約

６μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４．２μｍ～約４．８μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約３．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．５μｍ～約４μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４μｍ～約４．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．２μｍ～約３．８μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．８μｍ～約４．３μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約２μｍ、２．５μｍ、３μｍ、３．５μｍ、４μｍ、４．５μｍ、５μｍ、５．５μｍ、６μｍ、６．５μｍ、７μｍ、７．５μｍ、８μｍ、８．５μｍ、９μｍ、９．５μｍ、１０μｍ、１０．５μｍ、１１μｍ、１１．５μｍ、１２μｍ、１２．５μｍ、１３μｍ、１３．５μｍ、１４μｍ、１４．５μｍまたは１５μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約３．０μｍ、３．１μｍ、３．２μｍ、３．３μｍ、３．４μｍ、３．５μｍ、３．６μｍ、３．７μｍ、３．８μｍ、３．９μｍ、４．０μｍ、４．１μｍ、４．２μｍ、４．３μｍ、４．４μｍ、４．５μｍ、４．６μｍ、４．７μｍ、４．８μｍ、４．９μｍ、または５．０μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約４μｍである。

【０１６２】

狭窄部を用いて共刺激分子またはサイトカインをコードする核酸をＴＩＬに送達するいくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約３μｍ～約２０μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約５μｍ～約１５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約８μｍ～約１２μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約９μｍ～約１１μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約９．５μｍ～約１０．５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約７μｍ～約９μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約８μｍ～約１０μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約９μｍ～約１１μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約１０μｍ～約１２μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約１１μｍ～約１３μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約５μｍ～約１２μｍ、約６μｍ～約１２μｍ、約８μｍ～約１１μｍ、約９μｍ～約１１μｍ、約９．５μｍ～約１０．５μｍ、約８μｍ～約１５μｍ、約１０μｍ～約１５μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約９．７μｍ～約１０．３μｍである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約３μｍ、３．５μｍ、４μｍ、４．５μｍ、５μｍ、５．５μｍ、６μｍ、６．５μｍ、７μｍ、７．５μｍ、８μｍ、８．５μｍ、９μｍ、９．５μｍ、１０μｍ、１０．５μｍ、１１μｍ、１１．５μｍ、１２μｍ、１２．５μｍ、１３μｍ、１３．５μｍ、１４μｍ、１４．５μｍ、１５μｍ、１５．５μｍ、１６μｍ、１６．５μｍ、１７μｍ、１７．５μｍ、または１８μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、約９．０μｍ、９．１μｍ、９．２μｍ、９．３μｍ、９．４μｍ、９．５μｍ、９．６μｍ、９．７μｍ、９．８μｍ、９．９μｍ、１０．０μｍ、１０．１μｍ、１０．２μｍ、１０．３μｍ、１０．４μｍ、１０．５μｍ、１０．６μｍ、１０．７μｍ、１０．８μｍ、１０．９μｍ、または１１．０μｍのいずれか１つ以下である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は約１０．０μｍである。

【０１６３】

本発明のいくつかの実施形態では、組成物は複数のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最小の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％～約９９％である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最小の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％～約９０％、約１０％～約８０％、約１０％～約７０％、約２０％～約６０％、約４０％～約６０％、約３０％～約４５％、約５０％～約９９％、約５０％～約９０％、約５０％～約８０％、約５０％～約７０％、約６０％～約９０％、約６０％～約８０％、または約６０％～約７０％のいずれか１つである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最小の直径を有する

ＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％～約２０％、約２０％～約３０％、約３０％～約４０％、約４０％～約５０％、約５０％～約６０％、約６０％～約７０％、約７０％～約８０％、約８０％～約９０％、または約９０％～約９９％のいずれか１つである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最小の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％のいずれか１つである。

【０１６４】

本発明のいくつかの実施形態では、組成物は複数のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最大の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％～約９９％である。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最大の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約１０％～約９０％、約１０％～約８０％、約１０％～約７０％、約２０％～約６０％、約４０％～約６０％、約３０％～約４５％、約１５％～約３０％、約１５％～約２０％、約２０％～約２５％、約２５％～約３０％、約２０％～約３０％、約３０％～約７０％、または約３０％～約６０％のいずれか１つである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最大の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約５％～約１０％、約１０％～約２０％、約２０％～約３０％、約３０％～約４０％、約４０％～約５０％、約５０％～約６０％、約６０％～約７０％、約７０％～約８０％、約８０％～約９０％、または約９０％～約９９％のいずれか１つである。いくつかの実施形態では、狭窄部の幅は、ＴＩＬ集団内で最大の直径を有するＴＩＬの部分集団の平均直径の約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％のいずれか１つである。

【０１６５】

本明細書に記載の方法によって免疫反応を刺激するため化合物をＴＩＬに送達することに対し、いくつかのパラメータが影響を及ぼす可能性がある。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液を化合物と接触させるのは、狭窄部を通過させる前、通過させている間、または通過させた後である。ＴＩＬは、送達すべき化合物を含む溶液に懸濁された状態で、狭窄部を通過してもよく、一方、化合物は、ＴＩＬが狭窄部を通過した後に、細胞懸濁液に添加されてもよい。いくつかの実施形態では、送達すべき化合物は、狭窄部にコーティングされる。

【０１６６】

ＴＩＬへの化合物の送達に影響する可能性のあるパラメータの例には、狭窄部の寸法、狭窄部の入口角度、狭窄部の表面特性（たとえば、粗さ、化学修飾、親水性、疎水性など）、運転流速（たとえば、狭窄部を通過する細胞通過時間）、細胞濃度、細胞懸濁液中の化合物の濃度、細胞懸濁液中の緩衝剤、及び狭窄部通過後にＴＩＬが回復または修復する時間などが含まれるが、これらに限定されるものではない。これらは、送達される化合物のＴＩＬへの通過に影響する可能性がある。ＴＩＬへの化合物の送達に影響する別のパラメータには、狭窄部内のＴＩＬの速度、狭窄部内のせん断速度、細胞懸濁液の粘度、流速に垂直な速度成分、及び狭窄部内での時間がある。さらに、直列及び／または並列の流路を構成する複数のチップは、ＴＩＬへの送達に影響を与え得る。並列に配置された複数のチップは、スループットを向上させるのに役立ち得る。化合物の送達を制御するように、このようなパラメータを設計することができる。いくつかの実施形態では、細胞濃度は、約１０～少なくとも約10^{12}細胞／ｍＬの範囲、またはそれらの間の任意の濃度または濃度範囲である。いくつかの実施形態では、送達化合物の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１ｇ／ｍＬの範囲、またはそれらの間の任意の濃度または濃度範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、送達化合物の濃度は、約１ｐＭ～少なくとも約２Ｍの範囲、またはそれらの間の任意の濃度または濃度範囲であってもよい。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は約０

．０１μＭ～約１０ｍＭである。たとえば、いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は、約０．０１μＭ未満、約０．１μＭ未満、約１μＭ未満、約１０μＭ未満、約１００μＭ未満、約１ｍＭ未満、または約１０ｍＭ未満のいずれかである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は約１０ｍＭを超える。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は、約０．０１μＭ～約０．１μＭ、約０．１μＭ～約１μＭ、約１μＭ～約１０μＭ、約１０μＭ～約１００μＭ、約１００μＭ～約１ｍＭ、または１ｍＭ～約１０ｍＭのいずれかである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は約０．１μＭ～約１ｍＭである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は約０．１μＭ～約１０μＭである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされる共刺激分子の濃度は１μＭである。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約１ｎＭ～約１ｍＭである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約０．１ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約０．０１μＭ未満、約０．１μＭ未満、約１μＭ未満、約１０μＭ未満、約１００μＭ未満、約１ｍＭ未満、または約１０ｍＭ未満である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約１０ｍＭを超える。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約０．１ｎＭ～約１ｎＭ、約１ｎＭ～約１０ｎＭ、約１０ｎＭ～約１００ｎＭ、約０．１μＭ～約１μＭ、約１μＭ～約１０μＭ、約１０μＭ～約１００μＭ、約１００μＭ～約１ｍＭ、または１ｍＭ～約１０ｍＭのいずれかである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約１０ｎＭ～約１００ｎＭである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約１ｎＭ～約１０ｎＭである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬと共にインキュベートされるサイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸の濃度は、約５０ｎＭである。いくつかの実施形態では、核酸はｍＲＮＡである。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約１ｎＭ～約１ｍＭの濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約０．１ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約０．０１μＭ未満、約０．１μＭ未満、約１μＭ未満、約１０μＭ未満、約１００μＭ未満、約１ｍＭ未満、または約１０ｍＭ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約１０ｍＭ超の濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約０．１ｎＭ～約１ｎＭ、約１ｎＭ～約１０ｎＭ、約１０ｎＭ～約１００ｎＭ、約０．１μＭ～約１μＭ、約１μＭ～約１０μＭ、約１０μＭ～約１００μＭ、約１００μＭ～約１ｍＭ、または１ｍＭ～約１０ｍＭのいずれかの濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約１０ｎＭ～約１００ｎＭの濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約１ｎＭ～約１０ｎＭの濃度で含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を、約５０ｎＭの濃度で含む。いくつかの実施形態では、核酸はｍＲＮＡである。

【０１７０】

システム及びキット

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に開示された方法で使用するための狭窄部、ＴＩＬ懸濁液、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸のうちの１つ以上

を含むシステムを提供する。システムには、上記方法について説明した任意の実施形態を含めることができる。そのような実施形態には、細胞変形用狭窄部を与えるマイクロ流体流路または細胞変形用狭窄部を与える細孔を有する表面、細胞懸濁液、細胞摂動、送達パラメータ、化合物、及び／またはアプリケーションなどが含まれる。ある実施形態では、細胞変形用狭窄部は、ＴＩＬへの送達に適したサイズである。いくつかの実施形態では、運転流速、細胞及び化合物の濃度、狭窄部内の細胞の速度、及び細胞懸濁液の組成（たとえば、モル浸透圧濃度、塩濃度、血清含有量、細胞濃度、ｐＨなど）などの送達パラメータが、ＴＩＬの活性及び／または増殖能を増強するために最適化されている。

【０１７１】

さらに、がんまたは感染症の個体の治療に使用するためのキットまたは製品を提供する。いくつかの実施形態では、キットは、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸を細胞内に含むＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、キットは、がんまたは感染症の個体の治療に使用する改変されたＴＩＬを生成させるために使用する、狭窄部、ＴＩＬ懸濁液、サイトカイン及び／または共刺激分子をコードする核酸のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の組成物（たとえば、細孔を含むマイクロ流体流路または表面、細胞懸濁液、及び／または化合物）を適切なパッケージ内に含む。適切なパッケージ材料は、当該技術分野で既知であり、たとえば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、ジャー、フレキシブル包装（たとえば、密封マイラーバッグまたは密封プラスチックバッグ）などがある。これらの製品は、さらに滅菌及び／または密封されていてもよい。

【０１７２】

本発明はさらに、本明細書に記載された方法に係る構成要素を含むキットを提供する。該キットはさらに、治療が必要な個体を治療する上記方法を実施するための説明書、及び／またはサイトカイン及び／または共刺激分子をＴＩＬに導入するための説明書を含んでもよい。本明細書に記載のキットはさらに、他の材料を含んでもよく、そのような材料には、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、注射器、及び本明細書に記載の任意の方法を実施するための説明書（たとえば、治療を必要とする個体を治療するための説明書、または細胞内にサイトカイン及び／または共刺激分子を含むようにＴＩＬを改変するための説明書）を含む添付書類がある。

【０１７３】

例示的な実施形態

実施形態１．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法であって、前記ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする、前記方法。

【０１７４】

実施形態２．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の活性及び／または増殖能を調節する方法であって、前記ＴＩＬを改変して１つ以上の共刺激分子の発現が増加するようにする、前記方法。

【０１７５】

実施形態３．前記共刺激分子が、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である、実施形態１または２の方法。

【０１７６】

実施形態４．前記共刺激分子がＣＤ８６である、実施形態１または２の方法。

【０１７７】

実施形態５．ＴＩＬの表現型及び／または増殖能を調節する方法であって、前記ＴＩＬを改変して１つ以上のサイトカインの発現が増加するようにする、前記方法。

【０１７８】

実施形態６．前記ＴＩＬを改変して膜結合型キメラサイトカインを含むようにする、実

施形態１及び３～５のいずれか１つの方法。
【０１７９】
実施形態７．前記膜結合型キメラサイトカインが、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である、実施形態６の方法。
【０１８０】
実施形態８．前記サイトカインは、ペプチドリンカーによって前記膜貫通ドメインに結合されている、実施形態７の方法。
【０１８１】
実施形態９．前記ペプチドリンカーが、（Ｇ４Ｓ）３（配列番号３）または（ＥＡＡＡＫ）３（配列番号４）である、実施形態８の方法。
【０１８２】
実施形態１０．前記サイトカインが、Ｉ型サイトカインである、実施形態１及び３～９のいずれか１つの方法。
【０１８３】
実施形態１１．前記サイトカインが、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、もしくはＩＬ－２１またはそれらの機能的変異体である、実施形態１及び３～１０のいずれか１つの方法。
【０１８４】
実施形態１２．前記サイトカインが、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体及び／またはＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である、実施形態１１の方法。
【０１８５】
実施形態１３．前記膜結合型キメラサイトカインが、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む、実施形態７～１２のいずれか１つの方法。
【０１８６】
実施形態１４．前記改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、前記ＴＩＬを、
ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を前記投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで前記狭窄部の直径は前記懸濁液中の前記投入したＴＩＬの直径の関数であり、
ｂ）前記摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする前記１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸と共にインキュベートし、１つ以上のサイトカインをコードする前記１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸を前記摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、前記核酸を発現させ、それによって、前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子を含む前記改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製する、実施形態１～１３のいずれか１つの方法。
【０１８７】
実施形態１５．前記改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、前記ＴＩＬを、
ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を前記投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで前記狭窄部の直径は前記懸濁液中の前記投入したＴＩＬの直径の関数であり、
ｂ）前記摂動された投入したＴＩＬを、前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸と共にインキュベートして、前前記摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、前記核酸を発現させ、それによって前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子を含む前記改変されたＴＩ

Ｌを生成させることと、を含む方法によって調製する、実施形態１～１３のいずれか１つの方法。

【０１８８】

実施形態１６．

（ａ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｂ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカイン及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｃ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすることと、または

（ｄ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記１つ以上の共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、を含む、実施形態１４または１５の方法。

【０１８９】

実施形態１７．

（ａ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｂ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカイン及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｃ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすることと、または

（ｄ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記１つ以上の共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、を含む、実施形態１４または１５の方法。

【０１９０】

実施形態１８．前記核酸の１つ以上がｍＲＮＡである、実施形態１４～１７のいずれか１つの方法。

【０１９１】

実施形態１９．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している、実施形態１～１８のいずれか１つの方法。

【０１９２】

実施形態２０．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している、実施形態１～１８のいずれか１つの方法。

【０１９３】

実施形態２１．前記改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超増加している、実施形態１９または２０の方法。

【０１９４】

実施形態２１Ａ．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０１９５】

実施形態２１Ｂ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０１９６】

実施形態２１Ｃ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０１９７】

実施形態２１Ｄ．前記改変されたＴＩＬにおけるグランザイムＢの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍以上増加している、実施形態２１Ａ、２１Ｂまたは２１Ｃの方法。

【０１９８】

実施形態２２．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０１９９】

実施形態２３．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０２００】

実施形態２３Ａ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態１～２１のいずれか１つの方法。

【０２０１】

実施形態２４．前記外因性サイトカインがＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であり、場合により、前記外因性サイトカインがＩＬ－２である、実施形態２０～２３Ａのいずれか１つの方法。

【０２０２】

実施形態２５．改変されたＴＩＬを含む組成物であって、前記ＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子及び／または１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている、前記組成物。

【０２０３】

実施形態２６．改変されたＴＩＬを含む組成物であって、前記ＴＩＬは、１つ以上の共刺激分子の発現が増加するように改変されている、前記組成物。

【０２０４】

実施形態２７．前記共刺激分子が、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳＬ）、Ｂ７－１（ＣＤ８０）、Ｂ７－２（ＣＤ８６）、ＣＤ７０、ＬＩＧＨＴ、ＨＶＥＭ、ＣＤ４０、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＴＬ１Ａ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ３０Ｌ、ＴＩＭ４、ＳＬＡＭ、ＣＤ４８、ＣＤ５８、ＣＤ１５５、またはＣＤ１１２である、実施形態２５または２６の組成物。

【０２０５】

実施形態２８．前記共刺激分子がＣＤ８６である、実施形態２７の組成物。

【０２０６】

実施形態２９．改変されたＴＩＬを含む組成物であって、前記ＴＩＬは、１つ以上のサイトカインの発現が増加するように改変されている、前記組成物。

【０２０７】

実施形態３０．前記ＴＩＬは、膜結合型キメラサイトカインを含むように改変されている、実施形態２５及び２７～２９のいずれか１つの組成物。

【０２０８】
実施形態３１．前記膜結合型キメラサイトカインが、サイトカイン及び膜貫通ドメインを含む融合タンパク質である、実施形態３０の組成物。
【０２０９】
実施形態３２．前記サイトカインは、ペプチドリンカーによって前記膜貫通ドメインに結合されている、実施形態３１の組成物。
【０２１０】
実施形態３３．前記ペプチドリンカーが、（Ｇ４Ｓ）３（配列番号３）または（ＥＡＡＡＫ）３（配列番号４）である、実施形態３２の組成物。
【０２１１】
実施形態３４．前記サイトカインがＩ型サイトカインである、実施形態２５及び２７～３３のいずれか１つの組成物。
【０２１２】
実施形態３５．前記サイトカインが、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、もしくはＩＬ－２１またはそれらの機能的変異体である、実施形態２５及び２７～３４のいずれか１つの組成物。
【０２１３】
実施形態３６．前記サイトカインが、ＩＬ－２もしくはその機能的変異体及び／またはＩＬ－１２もしくはその機能的変異体である、実施形態３５の方法。
【０２１４】
実施形態３７．前記膜結合型キメラサイトカインが、配列番号７～１０のアミノ酸配列を含む、実施形態３０～３６のいずれか１つの組成物。
【０２１５】
実施形態３８．前記改変されたＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、前記改変されたＴＩＬは、
ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカインをコードする１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を前記投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで前記狭窄部の直径は前記懸濁液中の前記投入したＴＩＬの直径の関数であり、
ｂ）前記摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカインをコードする前記１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸と共にインキュベートし、１つ以上のサイトカインをコードする前記１つ以上の核酸及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸を前記摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、前記核酸を発現させ、それによって、前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子を含む前記改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製されている、実施形態２５～３７のいずれか１つの組成物。
【０２１６】
実施形態３９．前記ＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子の発現が増加しており、前記ＴＩＬは、
ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を前記投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで前記狭窄部の直径は前記懸濁液中の前記投入したＴＩＬの直径の関数であり、
ｂ）前記摂動された投入したＴＩＬを、１つ以上のサイトカイン及び／または１つ以上の共刺激分子をコードする前記１つ以上の核酸と共にインキュベートして、前記摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、前記核酸を発現させ、それによって前記１つ以上のサイトカイン及び／または前記１つ以上の共刺激分子を含む前記改変されたＴＩＬを生成させることと、を含む方法によって調製されている、実施形態２５～３７のいずれか１つの

組成物。

【０２１７】

実施形態４０．前記改変されたＴＩＬを調製する方法が、

（ａ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｂ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカイン及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｃ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、または

（ｄ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記１つ以上の共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、を含む、実施形態３８または３９の組成物。

【０２１８】

実施形態４１．前記改変されたＴＩＬを調製する方法が、

（ａ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｂ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカイン及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、

（ｃ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすることと、または

（ｄ）前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸及び前記１つ以上の共刺激分子をコードする前記核酸と共にインキュベートすること、を含む、実施形態３８～３９のいずれか１つの組成物。

【０２１９】

実施形態４２．前記核酸の１つ以上がｍＲＮＡである、実施形態３８～４１のいずれか１つの組成物。

【０２２０】

実施形態４３．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している、実施形態２５～４２のいずれか１つの組成物。

【０２２１】

実施形態４４．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、Ｔ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現が増加している、実施形態２５～４３のいずれか１つの組成物。

【０２２２】

実施形態４５．改変されたＴＩＬにおけるＴ－ｂｅｔ、ＥＯＭＥＳ、ＴＣＦ１、及びＣＤ６２Ｌのうちの１つ以上の発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍超増加している、実施形態４３または４４の組成物。

【０２２３】

実施形態４５Ａ．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも、

グランザイムＢの発現が増加している、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２２４】
実施形態４５Ｂ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２２５】
実施形態４５Ｃ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも、グランザイムＢの発現が増加している、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２２６】
実施形態４５Ｄ．前記改変されたＴＩＬにおけるグランザイムＢの発現は、改変されていない対応するＴＩＬよりも、約１．２倍、１．５倍、１．８倍、２倍、３倍、４倍、５倍、８倍、または１０倍以上増加している、実施形態４５Ａまたは４５Ｂまたは４５Ｃの組成物。
【０２２７】
実施形態４６．前記改変されたＴＩＬは、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２２８】
実施形態４７．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインを含まない培地で培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２２９】
実施形態４７Ａ．前記改変されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養された場合、改変されていない対応するＴＩＬよりも高い増殖を示す、実施形態２５～４５のいずれか１つの組成物。
【０２３０】
実施形態４８．前記外因性サイトカインがＩＬ－２及び／またはＩＬ－１２であり、場合により、前記外因性サイトカインがＩＬ－２である、実施形態４４～４７Ａのいずれか１つの組成物。
【０２３１】
実施形態４９．個体において免疫反応を調節する方法であって、前記改変されたＴＩＬを個体に投与することを含み、前記改変されたＴＩＬは実施形態１～２４のいずれか１つの方法に従って調製されている、前記方法。
【０２３２】
実施形態５０．実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物を投与することを含む、個体において免疫反応を調節する方法。
【０２３３】
実施形態５１．個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法であって、前記改変されたＴＩＬを個体に投与することを含み、前記改変されたＴＩＬは実施形態１～２４のいずれか１つの方法に従って調製されている、前記方法。
【０２３４】
実施形態５２．実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物を投与することを含む、個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療する方法。
【０２３５】
実施形態５３．前記改変されたＴＩＬを複数回投与すること、または前記組成物を複数回投与することを含む、実施形態４９～５２のいずれか１つの方法。
【０２３６】
実施形態５４．前記改変されたＴＩＬを静脈内または腫瘍内に投与する、実施形態４９～５３のいずれか１つの方法。
【０２３７】

実施形態５５．前記個体がヒトである、実施形態４９～５４のいずれか１つの方法。

【０２３８】

実施形態５６．前記改変されたＴＩＬを、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与する、実施形態４９～５５のいずれか１つの方法。

【０２３９】

実施形態５７．個体において免疫反応を刺激するための医薬組成物であって、実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物の有効量を含む、前記医薬組成物。

【０２４０】

実施形態５８．医薬として使用するための医薬組成物であって、実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物の有効量を含む、前記医薬組成物。

【０２４１】

実施形態５９．個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための医薬組成物であって、実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物の有効量を含む前記医薬組成物。

【０２４２】

実施形態６０．改変されたＴＩＬを含む前記組成物が、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与されるものである、実施形態５８または５９の医薬組成物。

【０２４３】

実施形態６１．前記狭窄部の幅が、前記投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％である、実施形態１～２４及び４９～５６のいずれか１つの方法、または実施形態２５～４８及び５７～６０のいずれか１つの組成物。

【０２４４】

実施形態６２．前記狭窄部の幅が、約３．５μｍ～約４．２μｍ、または約３．５μｍ～約４．８μｍ、または約３．５μｍ～約６μｍ、または約５μｍ～約１２μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍである、実施形態１～２４及び４９～５６のいずれか１つの方法、または実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物。

【０２４５】

実施形態６３．前記狭窄部の幅が約３μｍ～約５μｍである、実施形態１～２４及び４９～５６のいずれか１つの方法、または実施形態２５～４８及び５７～６０のいずれか１つの組成物。

【０２４６】

実施形態６４．前記狭窄部の幅が約４μｍである、実施形態１～２４及び４９～５６のいずれか１つの方法、または実施形態２５～４８及び５７～６０のいずれか１つの組成物。

【０２４７】

実施形態６５．複数の投入したＴＩＬを含む前記細胞懸濁液が、複数の狭窄部を通過させられ、ここで前記複数の狭窄部は、直列及び／または並列に配置されている、実施形態１～２４及び４９～５６のいずれか１つの方法、または実施形態２５～４８及び５７～６０のいずれか１つの組成物。

【０２４８】

実施形態６６．実施形態１～２４、４９～５６、及び６１～６５のいずれか１つの方法で使用するためのキット。

【０２４９】

実施形態６７．実施形態２５～４８及び５７～６５のいずれか１つの組成物を含むキット。

【０２５０】

実施形態６８．緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、注射器、または個体に前記組成物を投与するための説明書を含む添付文書のうちの１つ以上をさらに含む、実施形態６６または６７のキット。

【０２５１】
実施形態６９．膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬを作製する方法であって、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸をＴＩＬに導入することを含む、前記方法。
【０２５２】
実施形態７０．前記膜結合型キメラサイトカインを含む前記ＴＩＬを、
ａ）投入したＴＩＬを含む細胞懸濁液を細胞変形用狭窄部に通過させることにより、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする核酸が通過するのに十分な大きさの摂動を前記投入したＴＩＬに生じさせて摂動された投入したＴＩＬを形成することと、ここで前記狭窄部の直径は前記懸濁液中の前記投入したＴＩＬの直径の関数であり、
ｂ）前記摂動された投入したＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートして、前記核酸を前記摂動された投入したＴＩＬに入り込ませて、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸を発現させ、それによって膜結合型キメラサイトカインを含むＴＩＬを生成させることと、により調製する、実施形態６９の方法。
【０２５３】
実施形態７１．前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前、通過させている間、及び／または通過させた後に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすることを含む、実施形態７０の方法。
【０２５４】
実施形態７２．前記細胞懸濁液を前記細胞変形用狭窄部に通過させる前に、前記ＴＩＬを、前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸と共にインキュベートすることを含む、実施形態７０の方法。
【０２５５】
実施形態７３．前記膜結合型キメラサイトカインをコードする前記核酸が、前記膜結合型キメラサイトカインをコードするｍＲＮＡである、実施形態６９～７２のいずれか１つの方法。
【０２５６】
実施形態７４．前記狭窄部の幅が、前記投入したＴＩＬの平均直径の約１０％～約９９％である、実施形態７０～７３のいずれか１つの方法。
【０２５７】
実施形態７５．前記狭窄部の幅が、約５μｍ～約１２μｍ、または約６μｍ～約１２μｍ、または約８μｍ～約１１μｍ、または約９μｍ～約１１μｍ、または約１２μｍ～約１５μｍである、実施形態７０～７４のいずれか１つの方法。
【０２５８】
実施形態７６．前記狭窄部の幅が約１０μｍである、実施形態７０～７５のいずれか１つの方法。
【０２５９】
実施形態７７．前記狭窄部の幅が約８μｍである、実施形態７０～７６のいずれか１つの方法。
【０２６０】
実施形態７８．前記複数の投入したＴＩＬを含む前記細胞懸濁液を、複数の狭窄部に通過させ、ここで前記複数の狭窄部は、直列及び／または並列に配置されている、実施形態７０～７７のいずれか１つの方法。
【０２６１】
実施形態７９．個体において免疫反応を刺激するための医薬の製造における医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物は実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物の有効量を含む、前記使用。
【０２６２】
実施形態８０．個体においてがん、感染症、またはウイルス関連疾患を治療するための

医薬の製造における医薬組成物の使用であって、前記医薬組成物が実施形態２５～４８のいずれか１つの組成物の有効量を含む、前記使用。

【０２６３】

実施形態８１．前記医薬組成物が複数回投与用に処方されている、実施形態７９または８０の使用。

【０２６４】

実施形態８２．前記医薬組成物が、静脈内または腫瘍内に投与される、実施形態７９～８１のいずれか１つの使用。

【０２６５】

実施形態８３．　前記個体がヒトである、実施形態７９～８２のいずれか１つの使用。

【０２６６】

実施形態８４．　前記医薬組成物は、別の治療剤の投与前、投与と同時、または投与後に投与されるように処方されている、実施形態７９～８３のいずれか１つの使用。

【実施例】

【０２６７】

当業者には理解されるとおり、いくつかの実施形態が本発明の範囲及び趣旨内で可能である。これより以下の非限定的な実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。以下の実施例は、本発明をさらに例示説明するものであるが、当然のことながら、本発明の範囲を限定するものとして決して解釈されるべきものではない。

【０２６８】

実施例１：腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）は、膜結合型サイトカインをコードするｍＲＮＡの狭窄部による送達の後、４８時間にわたって膜結合型サイトカインを発現する

本実施例では、膜結合型ＩＬ－２（たとえば、ｍｂＩＬ－２）及び／または膜結合型ＩＬ－１２（たとえば、ｍｂＩＬ－１２）のｍＲＮＡの狭窄部による送達の後、４８時間にわたり、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）においてｍｂＩＬ－２及び／またはｍｂＩＬ－１２が発現することを示している。

【０２６９】

方法

ＴＩＬを解凍し、高濃度ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で２４時間培養した。培養後、ｍｂＩＬ－２をコードするｍＲＮＡ（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、ｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（各０．２５ｍｇ／ｍＬ、合計０．５ｍｇ／ｍＬ）を狭窄部による送達（「圧迫（スクイージング）」）によってＴＩＬに送達した。具体的には、上記ｍＲＮＡの存在下で、ＳＴ－１０－０４０－７０チップ（長さ１０ｕｍ、幅４ｕｍ、深さ７０ｕｍ）を使用して、ＴＩＬを３０ｐｓｉで圧迫処理した。ダウンストリーム解析用対照として、投入材料なしで及びＧＦＰのｍＲＮＡを用いて、狭窄部による送達を同様に行った。圧迫により送達されたｍＲＮＡを含むＴＩＬを、高濃度ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む培養培地に再懸濁した。蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して、再懸濁後４時間、２４時間、及び４８時間で膜結合型サイトカインの発現を測定した。特に、細胞生存率、ＧＦＰｍｂＩＬ－２及び／またはｍｂＩＬ－１２を発現する細胞の百分率、ならびにＧＦＰ発現、ｍｂＩＬ－２発現、及びｍｂＩＬ－１２発現の平均蛍光強度（たとえば、ＭＦＩ）を評価した（図１Ａ～１Ｄ及び図２Ａ～２Ｃ）。表１は、ＴＩＬを評価するために使用したＦＡＣＳプロトコルの概要を示している。

【表１】

表１．実施例１のアッセイに対応するフローチャート

	発光（ｎｍ）	流路	蛍光色素	対象	抗体クローン	最終希釈率
紫（４０５ｎｍ）	４４０／５０	ＶＬ－１	パシフィックブルー	ＣＤ３	ＳＫ７	１：２００
青（４８８ｎｍ）	５３０／３０	ＢＬ－１	ＧＦＰ	ｍＲＮＡ発現	該当なし	０．２５ｍｇ／ｍＬで送達
黄（５６１ｎｍ）	５８５／１６	ＹＬ－１	ＰＥ	ｍｂＩＬ１２	２０Ｃ２	１：２００
赤（６３８ｎｍ）	６７０／１４	ＲＬ－１	ＡＰＣ	ｍｂＩＬ２	ＭＱ１－１７Ｈ１２	１：２００
	７８０／６０	ＲＬ－３	近赤外Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ	生存率		１：１０００

【０２７０】

結果

図１Ａに示すように、生存率は、圧迫後のすべての測定時点（４時間、１日目、及び２日目）で一貫して８０～９０％であった。ＴＩＬの生存率は、高ＩＬ－２培養培地において時間の経過と共に増加する。これは、４時間後と２日後のＴＩＬの生存率の比較により明らかである。

【０２７１】

ＧＦＰｍＲＮＡ陽性対照が示すように、狭窄部による送達法を使用するとｍＲＮＡがＴＩＬに効果的に送達されＴＩＬで効果的に発現された（図１Ｂ及び図２Ａ）。狭窄部による送達法によりｍＲＮＡを送達した場合、ＴＩＬは、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２を首尾よく発現し、さらにｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を同時に首尾よく発現した。これは、サイトカイン発現細胞の百分率とＭＦＩ発現の両方で明らかにされているとおりである（たとえば、図１Ｃ～１Ｄ及び図２Ｂ～２Ｃを参照）。

【０２７２】

実施例２：ＴＩＬは、膜結合型サイトカインをコードするｍＲＮＡを狭窄部によって送達し、さまざまなＩＬ－２濃度で培養すると、７日間にわたり膜結合型サイトカインを発現する

本実施例では、膜結合型ＩＬ－２（たとえば、ｍｂＩＬ－２）及び膜結合型ＩＬ－１２（たとえば、ｍｂＩＬ－１２）をコードするｍＲＮＡを狭窄部により送達した後、さまざまなＩＬ－２濃度の存在下で培養した場合、７日間にわたってｍｂＩＬ－２またはｍｂＩＬ－１２が発現することを示している。

【０２７３】

方法

ＴＩＬを解凍し、高濃度ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で２４時間培養した。培養後、ｍｂＩＬ－２（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、ｍｂＩＬ－１２（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方（０．２５ｍｇ／ｍＬ）をコードするｍＲＮＡを、狭窄部による送達によってＴＩＬに送達した。上記ｍＲＮＡの存在下で、ＳＴ－１０－０４０－７０チップ（長さ１０ｕｍ、幅４ｕｍ、深さ７０ｕｍ）を使用して、ＴＩＬを３０ｐｓｉで圧迫処理した。圧迫により送達されたｍＲＮＡを含むＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ、及び０ＩＵ／ｍＬの濃度のＩＬ

－２を含む培養培地に再懸濁し、合計７日間培養した。蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して、再懸濁後１日目、３日目、及び７日目にサイトカインの発現を測定した。特に、細胞生存率、増殖、サイトカインを発現する細胞の百分率、及びｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２の発現の平均蛍光強度（たとえば、ＭＦＩ）を評価した。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬの生存率を図３Ａ～３Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後の生存ＴＩＬの増殖を図４Ａ～４Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ３９の発現を図５Ａ～５Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ３９とＣＤ６９の共発現を図６Ａ～６Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ６２Ｌの発現を図７Ａ～７Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ６９の発現を図８Ａ～８Ｈに示す。図９Ａ～９Ｄ、１０Ａ～１０Ｄ、及び１１Ａ～１１Ｄは、それぞれｍｂＩＬ－２、またはｍｂＩＬ－１２、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現するＴＩＬの百分率を示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴ－ｂｅｔを発現するＴＩＬの百分率を図１２Ａ～１２Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＥｏｍｅｓ及びＴＣＦ－１を発現するＴＩＬの百分率を図１３Ａ～１３Ｄに示す。各アッセイは、培養培地中のＩＬ－２の各濃度に対して実施した。

【０２７４】

表２及び３は、ＴＩＬの表面成分及び核成分を評価するために使用したＦＡＣＳプロトコルの概要を示す。

【表２】

表２．実施例２の細胞表面染色アッセイに対応するフローチャート

	発光（ｎｍ）	流路	蛍光色素	対象	最終希釈率
紫（４０５ｎｍ）	４４０／５０	ＶＬ－１	パシフィックブルー	ＩＬ－１２	１：２００
	６０３／２８	ＶＬ－３	ＢＶ６０５	ＣＤ６２Ｌ	１：２００
青（４８８ｎｍ）	５３０／３０	ＢＬ－１	ＦＩＴＣ	ＣＤ３９	１：２００
黄（５６１ｎｍ）	５８５／１６	ＹＬ－１	ＰＥ	ＣＤ３	１：２００
	７８０／６０	ＹＬ－４	ＰＥ－Ｃｙ７	ＣＤ６９	１：２００
赤（６３８ｎｍ）	６７０／１４	ＲＬ－１	ＡＰＣ	ＩＬ－２	１：２００
	７８０／６０	ＲＬ－３	ＮＩＲ	Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ	１：１０００

【表３】

表３．実施例２の核染色アッセイに対応するフローチャート

	発光（ｎｍ）	流路	蛍光色素	対象	最終希釈率
紫（４０５ｎｍ）	４４０／５０	ＶＬ－１	ＢＶ４２１	Ｔ－ｂｅｔ	１：２００
青（４８８ｎｍ）	５３０／３０	ＢＬ－１	ＦＩＴＣ	Ｅｏｍｅｓ	１：２００
	６９５／４０	ＢＬ－３	ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５	ＣＤ３	１：２００
黄（５６１ｎｍ）	５８５／１６	ＹＬ－１	ＰＥ	ＴＣＦ－１	１：２００
赤（６３８ｎｍ）	７８０／６０	ＲＬ－３	ＮＩＲ	Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ	１：１０００

【０２７５】

結果

図３Ａ～３Ｃに示すように、３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、及び３０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２培養培地で試験したすべての細胞について、生存率はすべての時点で一貫して約８５％を超えていた。ＩＬ－２を含まない培地中のＴＩＬの生存率は、３日目まで約８５％を超えていた（図３Ｄ）。３０００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ、及び３０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地ではすべてのＴＩＬについて増殖が増加し（図４Ａ～４Ｃ）、ＩＬ－２を含まない培地で培養したＴＩＬの増殖は、３日目まで、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２培地で培養した対応するＴＩＬの増殖と同様であった。

【０２７６】

圧迫によりｍＲＮＡを送達した場合、ＴＩＬは、ｍｂＩＬ－２、ｍｂＩＬ－１２を首尾よく発現し、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を同時に首尾よく発現した。これは、それぞれのサイトカインを発現する細胞の百分率によって明らかなとおりである（たとえば、図９Ａ～９Ｄ、１０Ａ～１０Ｄ、及び１１Ａ～１１Ｄを参照）。図９Ａ～９Ｄに示すように、各ＩＬ－２の培地濃度において、圧迫による送達後２日間でｍｂＩＬ－２の発現が減少した。ｍｂＩＬ－２の発現は、ｍＲＮＡ送達後１日目に最も高くなり、３日目にはごくわずかになった（図９Ａ～９Ｄ）。ｍｂＩＬ－１２の発現は、ｍＲＮＡの圧迫による送達後のインキュベーション中、各ＩＬ－２の培地濃度において、圧迫による送達後２日間で同様に減少した（図１０Ａ～１０Ｄ）。図１０Ａ～１０Ｄに示すように、ｍｂＩＬ－１２の発現は、ｍＲＮＡの圧迫による送達後１日目に最も高くなり、時間の経過と共に徐々に減少した。同様に、ｍｂ－ＩＬ２とｍｂＩＬ－１２の共発現は、それぞれのｍＲＮＡの圧迫による送達後のインキュベーション中、各ＩＬ－２培地濃度において、圧迫による送達後２日間で減少した（図１１Ａ～１１Ｄ）。

【０２７７】

ｍＲＮＡを圧迫により送達し次いでＩＬ－２と共にインキュベートした後、ＴＩＬの表現型をさらに評価した。図５Ａ～５Ｄに示すとおり、ＣＤ３９の発現は、ＩＬ－２培養条件に関係なくすべてのＴＩＬにわたって同様であった。ＣＤ６２Ｌ（セントラルメモリーＴ細胞）の発現は、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡの組み合わせを送達し続いて培養培地中でＩＬ－２と共にインキュベートした１日目に最も高かった（図７Ａ～７Ｄ）。ＣＤ６９の発現は、ＩＬ－２培地で培養されたすべてのＴＩＬにおいて１日目と７日

目には同様であったが、３日目までに減少した（図８Ａ～８Ｈ）。図１２Ａ～１２Ｄに示すように、ｍｂＩＬ－２、ｍｂＩＬ－１２、またはｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２の両方を発現するＴＩＬでは、培養培地中のＩＬ－２の濃度が高くなるにつれて、Ｔ－ｂｅｔの発現が増加した。ＴＩＬは、圧迫によるｍＲＮＡの送達後３日目に、Ｅｏｍｅｓ及びＴＣＦ－１のより高い発現を示した（図１３Ａ～１３Ｄ）。

【０２７８】

実施例３：ＴＩＬは、ｍｂＩＬ－２、ｍｂＩＬ－１２、及びＣＤ８６をコードするｍＲＮＡを狭窄部により送達してさまざまなＩＬ－２濃度で培養すると、３日間にわたって膜結合型サイトカインを発現する

本実施例では、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２またはＣＤ８６をコードするｍＲＮＡの圧迫による送達を受けたＴＩＬがｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２を発現することを示すとともに、それらがＴＩＬの表現型に与える影響を示す。

【０２７９】

方法

ＴＩＬを解凍し、高濃度ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で２４時間培養した。培養後、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（０．１ｍｇ／ｍＬ）、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（０．５ｍｇ／ｍＬ）、ＣＤ８６とｍｂＩＬ－２をコードするｍＲＮＡ（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、ＣＤ８６とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（０．２５ｍｇ／ｍＬ）、またはＣＤ８６とｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（各０．２５ｍｇ／ｍＬ）を、ＳＴ－１０－０４０－７０チップ（長さ１０ｕｍ、幅４ｕｍ、深さ７０ｕｍ）を使用した３０ｐｓｉでの圧迫処理により、ＴＩＬに送達した。狭窄部により送達されたｍＲＮＡを含むＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むかまたはＩＬ－２を含まない培養培地に再懸濁して３日間培養した。蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して、再懸濁後１日目及び３日目にサイトカインの発現を測定した。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬの生存率を図１４Ａ及び１４Ｂに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後の生存ＴＩＬの増殖を図１５Ａ及び１５Ｂに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ３９の発現を図１６Ａ及び１６Ｂに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後のＴＩＬにおけるＣＤ６２Ｌの発現を図１７Ａ及び１７Ｂに示す。図１８Ａ及び１８ＢはＣＤ８６の平均蛍光強度を示している。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後にｍｂＩＬ－２を発現するＴＩＬの百分率を図１９Ａ～１９Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後にｍｂＩＬ－１２を発現するＴＩＬの百分率を図２０Ａ～２０Ｄに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後にＴ－ｂｅｔを発現するＴＩＬの百分率を図２１Ａ及び２１Ｂに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後にＥｏｍｅｓを発現するＴＩＬの百分率を図２２Ａ及び２２Ｂに示す。ｍＲＮＡの圧迫による送達及びＩＬ－２存在下でのインキュベーション後にＥｏｍｅｓ＋ＴＣＦ－１を発現するＴＩＬの百分率を図２３Ａ及び２３Ｂに示す。

【０２８０】

表４及び５は、ＴＩＬの表面成分及び核成分を評価するために使用したＦＡＣＳプロトコルの概要を示す。

【表４】

表４．実施例３の細胞表面染色アッセイに対応するフローチャート

	発光（ｎｍ）	流路	蛍光色素	対象	最終希釈率
紫（４０５ｎｍ）	４４０／５０	ＶＬ－１	パシフィックブルー	ＩＬ－１２	１：２００
	６０３／２８	ＶＬ－３	ＢＶ６０５	ＣＤ６２Ｌ	１：２００
青（４８８ｎｍ）	５３０／３０	ＢＬ－１	ＦＩＴＣ	ＣＤ３９	１：２００
黄（５６１ｎｍ）	５８５／１６	ＹＬ－１	ＰＥ	ＣＤ３	１：２００
	７８０／６０	ＹＬ－４	ＰＥ－Ｃｙ７	ＣＤ８６	１：２００
赤（６３８ｎｍ）	７２０／３０	ＲＬ－１	ＡＰＣ	ＩＬ－２	１：２００
	７８０／６０	ＲＬ－３	ＮＩＲ	Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ	１：１０００

【表５】

表５．実施例３の核染色アッセイに対応するフローチャート

	発光（ｎｍ）	流路	蛍光色素	対象	最終希釈率
紫（４０５ｎｍ）	４４０／５０	ＶＬ－１	ＢＶ４２１	Ｔ－ｂｅｔ	１：２００
青（４８８ｎｍ）	６９５／４０	ＢＬ－３	ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５	ＣＤ３	１：２００
黄（５６１ｎｍ）	５８５／１６	ＹＬ－１	ＰＥ	ＴＣＦ－１	１：２００
	６７０／１４	ＲＬ－１	ＡＰＣ	Ｅｏｍｅｓ	１：２００
赤（６３８ｎｍ）	７８０／６０	ＲＬ－３	ＮＩＲ	Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ	１：１０００

【０２８１】

結果

図１４Ａ～１４Ｂに示すように、３０００ＩＵ／ｍＬで試験したすべての細胞について、生存率は、すべての複製物（たとえば、１日目と３日目）で一貫して約８５％を超えていた。ＩＬ－２を含まない培地中のＴＩＬの生存率は、３日目まで約８５％を超えていた（図１４Ｂ）。ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２またはＣＤ８６をコードするｍＲＮＡを含むＴＩＬは、０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２培地で高い生存率を示す。ｍｂＩＬ－２及びｍｂ

ＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ及び／またはＣＤ８６のｍＲＮＡが圧迫により送達されたＴＩＬは、その増殖が増加した（図１５Ａ～１５Ｂ）。

【０２８２】

圧迫処理によりｍＲＮＡを送達した場合、ＴＩＬは、ｍｂＩＬ－２とｍｂＩＬ－１２、及びＤＣ８６を首尾よく発現した。これは、サイトカインを発現する細胞の百分率とＭＦＩ発現の両方によって明らかなとおりである（たとえば、図１９Ａ～１９Ｄ及び２０Ａ～２０Ｄを参照）。図１９Ａ～１９Ｄ及び２０Ａ～２０Ｄに示すように、圧迫による処理を受けたｍｂＩＬ－２及び／またはｍｂＩＬ－１２をコードするより高い濃度のｍＲＮＡ（０．５ｍｇ／ｍＬ）では、圧迫による処理を受けたｍｂＩＬ－２及び／またはｍｂＩＬ－１２をコードする０．２５ｍｇ／ｍＬのｍＲＮＡに対して、各サイトカインを発現する細胞の百分率が同等であり、３日間でそれぞれｍｂＩＬ－２及び／またはｍｂＩＬ－１２の発現が全体的に増加を示した。

【０２８３】

圧迫処理によりｍＲＮＡが導入されたＴＩＬの表現型をさらに評価した。図１６Ａ～１６Ｂに示すとおり、ＣＤ３９は、ＩＬ－２培養条件に関係なく、すべてのＴＩＬについて同様であった。ＣＤ６２Ｌ（セントラルメモリーＴ細胞）の発現は、ｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡの存在下で向上した（図１７Ａ～１７Ｂ）。ＣＤ８６ＭＦＩは、ＴＩＬ中にｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡが存在することで、同様に向上した（図１８Ａ～１８Ｂ）。ｍＲＮＡを導入されたＴＩＬで培養培地中のＩＬ－２濃度が高い場合、Ｅｏｍｅｓ＋及びＴＣＦ－１＋の発現が増強された（図２３Ａ～２３Ｂ）。

【０２８４】

実施例４：腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）は、膜結合型サイトカインをコードするｍＲＮＡの狭窄部による送達後、外因性ｒｈＩＬ２を追加することなく、最大７２時間まで膜結合型サイトカインを発現する

本実施例では、膜結合型ＩＬ－２（たとえば、ｍｂＩＬ－２）及び膜結合型ＩＬ－１２（たとえば、ｍｂＩＬ－１２）のｍＲＮＡの狭窄部による送達の後、７２時間にわたり、ＴＩＬにおいてｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２が発現することを示している。

【０２８５】

方法

ＴＩＬを解凍し、ある濃度のＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む培地で２４時間培養した。培養後、２つの群において、（１）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（合計０．２５ｍｇ／ｍＬ）と（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡ（合計０．５０ｍｇ／ｍＬ）を、それぞれ狭窄部による送達（「圧迫（スクイージング）」）によってＴＩＬに送達した。上記ｍＲＮＡの存在下で、ＳＴ－１０－０４－７０チップ（長さ１０μｍ、幅４μｍ、深さ７０μｍ）を使用して、ＴＩＬを３０ｐｓｉで圧迫処理した。ダウンストリーム解析用対照（対照ＴＩＬ）として、投入材料なしで、狭窄部による送達を同様に行った。圧迫により送達されたｍＲＮＡを含むＴＩＬを、外因性ｒｈＩＬ－２を含まない培養培地に再懸濁し、３日間培養した。ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２について生存率と発現をフローサイトメトリーにより定量した。（図２４Ａ～２４Ｅ）。

【０２８６】

結果

図２４Ａに示すように、圧迫により送達されたｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡを含む改変されたＴＩＬの生存率は、圧迫後のすべての測定時点（０、１、２、及び３日目）で一貫して高かった（約８０％）。

【０２８７】

図２４Ｂ～Ｅに示すように、ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡは、狭窄部による送達法により、ＴＩＬに同時に効果的に送達され、その後発現された。

【０２８８】

実施例５：膜結合型サイトカインをコードするｍＲＮＡを圧迫により導入されたＴＩＬ

は、腫瘍との共培養で増殖する
本実施例に示すとおり、圧迫により導入されたｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のＲＮＡを含むＴＩＬの増殖を３日目に分析し、腫瘍細胞との共培養において、各サンプルの生存ＣＤ８＋Ｔ細胞の数を測定し、Ｋｉ６７の発現をフローサイトメトリーにより分析し、さらにグランザイムＢの発現をフローサイトメトリーにより分析した。
【０２８９】
方法
ＴＩＬを３人の黒色腫患者の腫瘍組織から分離した。ＴＩＬを解凍し、ｒｈＩＬ－２を含まない培地で一晩培養した。培養後、２つの群において、（１）ｍｂＩＬ－２をコードするｍＲＮＡと（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡを、それぞれ狭窄部による送達（「圧迫（スクイージング）」）によってＴＩＬに送達した。上記ｍＲＮＡの存在下で、ＳＴ－１０－０４－７０チップ（長さ１０μｍ、幅４μｍ、深さ７０μｍ）を使用して、ＴＩＬを３０ｐｓｉで圧迫処理した。ダウンストリーム解析用対照（対照ＴＩＬ）として、投入材料なしで、狭窄部による送達を同様に行った。次いで圧迫処理されたＴＩＬを外因性サイトカインなしで自己腫瘍細胞の存在下において３日間培養した。追加の対照として、投入材料なしで圧迫したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）を、３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２及び１０ｎｇ／ｍＬのｒｈＩＬ－１２を含む培地で自己腫瘍細胞と共に培養した。
【０２９０】
結果
図２５Ａに示すように、ｍｂＩＬ２のｍＲＮＡのみと共にまたはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫され、外因性ＩＬ－２もＩＬ－１２もなしで自己腫瘍細胞の存在下で培養されたＴＩＬは、各ドナーサンプル中のＣＤ８＋Ｔ細胞の数で測定すると、３つのドナーサンプルすべてについて、投入材料なしで圧迫されたＴＩＬ（対照ＴＩＬ）よりも高い細胞増殖を示した。図２５Ｂに示すように、ｍｂＩＬ２のｍＲＮＡのみと共にまたはｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫され、外因性ＩＬ－２もＩＬ－１２もなしで自己腫瘍細胞の存在下で培養されたＴＩＬは、３つのドナーサンプルすべてについて、投入材料なしで圧迫されたＴＩＬ（対照ＴＩＬ）よりも、高いＫｉ６７発現を示し、各サンプル中のＫｉ６７陽性細胞の割合が高かった。図２６に示すように、自己腫瘍細胞との共培養２０時間後にフローサイトメトリーによりグランザイムＢの発現についてＴＩＬを分析した結果、同様に、（１）ｍｂＩＬ２のｍＲＮＡのみと共にまたは（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫され、外因性ＩＬ－２もＩＬ－１２もなしで自己腫瘍細胞と共培養されたＴＩＬは、対照ＴＩＬよりも高いグランザイムＢの発現を示した。
【０２９１】
実施例６：膜結合型サイトカインをコードするｍＲＮＡを圧迫により導入したＴＩＬは、自己腫瘍細胞と共培養した場合、腫瘍を殺傷する
本実施例に示すとおり、外因性ｒｈＩＬ－２及びｒｈＩＬ－１２の存在下で腫瘍細胞と共培養した対照ＴＩＬとの比較において、（１）ｍｂＩＬ２のｍＲＮＡと共にまたは（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫され、外因性サイトカインの非存在下で腫瘍細胞と共培養されたＴＩＬは、腫瘍を殺傷する。
【０２９２】
方法
ＴＩＬを解凍し、サイトカインを含まない培地で、２：１の比で自己腫瘍細胞株と共に１～２日間培養した。自己腫瘍細胞株は、Ｃｙｔｏｌｉｇｈｔ　Ｒｅｄで染色し、ＩｎｃｕＣｙｔｅ蛍光顕微鏡を使用して２４時間画像撮影した。培養後、２つの群において、（１）ｍｂＩＬ－２をコードするｍＲＮＡと（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２をコードするｍＲＮＡを、それぞれ狭窄部による送達（「圧迫（スクイージング）」）によってＴＩＬに送達した。上記ｍＲＮＡの存在下で、ＳＴ－１０－０４－７０チップ（長さ１０μｍ、幅４μｍ、深さ７０μｍ）を使用して、ＴＩＬを３０ｐｓｉで圧迫処理した。ダウ

ンストリーム解析用対照（対照ＴＩＬ）として、投入材料なしで、狭窄部による送達を同様に行った。次いで圧迫処理したＴＩＬを外因性サイトカインの非存在下において自己腫瘍細胞と共培養した。追加の対照として、投入材料なしで圧迫したＴＩＬ（対照ＴＩＬ）を、３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２及び１０ｎｇ／ｍＬのｒｈＩＬ－１２を含む培地で自己腫瘍細胞と共に培養した。ＩｎｃｕＣｙｔｅ画像に赤色マスクを適用し、腫瘍コンフルエンスの割合を計算するために使用した。

【０２９３】

結果

図２７Ａ～Ｄに示すとおり、（１）ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡまたは（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下での共培養において、外因性ｒｈＩＬ－２及びｒｈＩＬ－１２によってサポートされながら腫瘍細胞と共培養された対照ＴＩＬと同等の腫瘍殺傷能力を示している。さらに（１）ｍｂＩＬ－２のｍＲＮＡまたは（２）ｍｂＩＬ－２及びｍｂＩＬ－１２のｍＲＮＡと共に圧迫されたＴＩＬは、外因性サイトカインの非存在下での共培養において、外因性サイトカインの非存在下で共培養された対照ＴＩＬよりも有意に高い腫瘍殺傷能力を示している。

【表６】

配列表

1	ＡＴＧＡＴＧＧＴＧＧＡＣＧＧＣＧＡＣＡＡＣＡＧＣＣＡＣＧＴＧＧ ＡＡＡＴＧＡＡＧＣＴＧＧＣＣＧＴＧＧＡＣＧＡＧＧＡＡＧＡＧＡＡ ＣＧＣＣＧＡＣＡＡＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧＣＣＡＡＣＧＴＧＡＣＣ ＡＡＧＣＣＴＡＡＧＡＧＡＴＧＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＡＴＣＴＧＣＴ ＡＣＧＧＣＡＣＡＡＴＣＧＣＣＧＴＧＡＴＣＧＴＧＴＴＣＴＴＣＣＴ ＧＡＴＣＧＧＣＴＴＴＡＴＧＡＴＣＧＧＣＴＡＣＣＴＧＧＧＣＴＡＣ ＴＧＣＡＡＧＡＧＣＡＧＴＧＡＴＧＧＡＣＣＴＧＧＣＧＡＡＡＣＡＧ ＧＣＧＧＡＧＧＣＧＧＡＧＧＡＴＣＴＧＧＴＧＧＣＧＧＡＧＧＡＡＧ ＣＧＧＴＧＧＣＧＧＣＧＧＡＴＣＴＴＧＴＧＡＴＣＴＧＣＣＴＣＡＧ ＡＣＡＣＡＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＡＧＣＡＧＡＣＧＡＡＣＡＣＴＧＡ ＴＧＣＴＧＣＴＧＧＣＣＣＡＧＡＴＧＣＧＧＡＡＧＡＴＣＡＧＣＣＴ ＧＴＴＣＡＧＣＴＧＣＣＴＧＡＡＧＧＡＣＣＧＧＣＡＣＧＡＴＴＴＣ ＧＧＣＴＴＣＣＣＴＣＡＡＧＡＧＧＡＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＣＡＧＴ ＴＣＣＡＧＡＡＧＧＣＣＧＡＧＡＣＡＡＴＣＣＣＴＧＴＧＣＴＧＣＡ ＣＧＡＧＡＴＧＡＴＣＣＡＧＣＡＧＡＴＣＴＴＣＡＡＣＣＴＧＴＴＣ ＴＣＣＡＣＣＡＡＧＧＡＣＡＧＣＡＧＣＧＣＣＧＣＣＴＧＧＧＡＴＧ ＡＧＡＣＡＣＴＧＣＴＧＧＡＣＡＡＧＴＴＣＴＡＣＡＣＣＧＡＧＣＴ ＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＴＧＡＣＣＴＧＧＡＡＧＣＣＴＧＣ ＧＴＧＡＴＣＣＡＡＧＧＣＧＴＧＧＧＡＧＴＧＡＣＡＧＡＧＡＣＡＣ ＣＣＣＴＧＡＴＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴＡＧＣＡＴＣＣＴＧＧＣＣＧＴ ＧＣＧＣＡＡＧＴＡＣＴＴＣＣＡＧＣＧＧＡＴＣＡＣＣＣＴＧＴＡＣ ＣＴＧＡＡＡＧＡＧＡＡＧＡＡＧＴＡＣＡＧＣＣＣＣＴＧＣＧＣＣＴ ＧＧＧＡＡＧＴＣＧＴＧＣＧＧＧＣＣＧＡＡＡＴＣＡＴＧＡＧＡＡＧ ＣＴＴＣＡＧＣＣＴＧＡＧＣＡＣＣＡＡＣＣＴＧＣＡＡＧＡＧＡＧＣ ＣＴＧＣＧＧＡＧＣＡＡＡＧＡＧＴＧＡ	ＴＦＲＣ ＿Ｇ４Ｓ ＿ＩＦＮ －ａ２ａ ｍＲＮＡ
2	ＡＴＧＡＴＧＧＴＧＧＡＣＧＧＣＧＡＣＡＡＣＡＧＣＣＡＣＧＴＧＧ ＡＡＡＴＧＡＡＧＣＴＧＧＣＣＧＴＧＧＡＣＧＡＧＧＡＡＧＡＧＡＡ ＣＧＣＣＧＡＣＡＡＣＡＡＣＡＣＣＡＡＧＧＣＣＡＡＣＧＴＧＡＣＣ ＡＡＧＣＣＴＡＡＧＡＧＡＴＧＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＡＴＣＴＧＣＴ ＡＣＧＧＣＡＣＡＡＴＣＧＣＣＧＴＧＡＴＣＧＴＧＴＴＣＴＴＣＣＴ	ＴＦＲＣ ＿Ｇ４Ｓ ＿ＩＬ－ １２　ｍ ＲＮＡ

	GATCGGCTTTATGATCGGCTACCTGGGCTAC TGCAAGAGCAGTGATGGACCTGGCGAAACAG GCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAG TGGCGGCGGAGGTTCTATTTGGGAGCTGAAG AAAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGT ATCCCGATGCTCCTGGCGAGATGGTGGTGCT GACCTGCGATACCCCTGAAGAGGACGGCATC ACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGC TCGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGT GAAAGAGTTTGGCGACGCCGGCCAGTACACC TGTCACAAAGGCGGAGAAGTGCTGAGCCACA GCCTGCTGCTGCTCCACAAGAAAGAGGATGG CATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGAT GCGAGGCCAAGAACTACAGCGGCCGGTTCAC ATGTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCGAC CTGACCTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCA GCAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGC CGCTACACTGTCTGCCGAAAGAGTGCGGGGC GATAACAAAGAATACGAGTACAGCGTGGAAT GCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGA AGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTCGAC GCCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACA CCAGCAGCTTTTTTCATCCGGGACATCATCAA GCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTGAAG CCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGT CCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACACC CCACAGCTACTTCAGCCTGACCTTTTGCGTG CAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAAA AGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGC CACCGTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATC AGCGTCAGAGCCCAGGACCGGTACTACAGCA GCTCTTGGAGCGAATGGGCCAGCGTGCCATG TAGCGGAGGTGGTGGTAGCGGAGGCGGCGGA AGCGGCGGTGGTGGATCAGGTGGTGGTGGCT CTAGAAACCTGCCAGTGGCTACCCCTGATCC TGGCATGTTCCCTTGTCTGCACCACAGCCAG AACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGC AGAAGGCCAGACAGACCCTGGAATTCTACCC CTGCACCAGCGAGGAAATCGACCACGAGGAC ATCACCAAGGATAAGACCAGCACCGTGGAAG CCTGCCTGCCTCTGGAACTGACCAAGAACGA GAGCTGCCTGAACAGCCGGGAAACCTCCTTC	

10

20

30

40

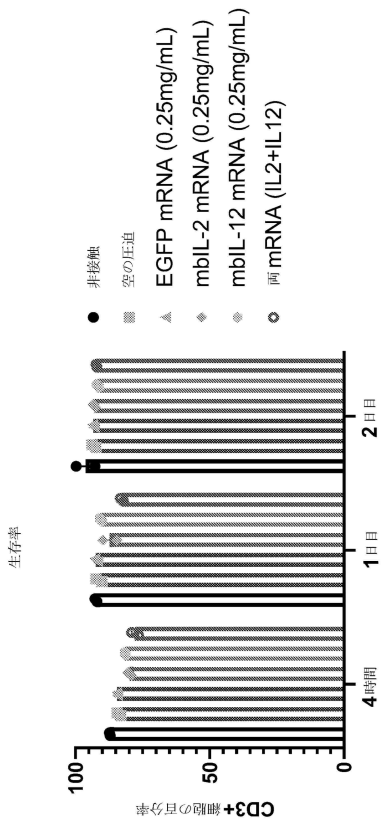
50

	ATCACCAACGGCTCTTGCCTGGCCAGCAGAA AGACAAGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAG CAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAG GTGGAATTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGC TGATGGACCCCAAGCGGCAGATCTTCCTGGA CCAGAACATGCTGGCTGTGATCGACGAGCTG ATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGCGAGACAG TGCCCCAGAAGTCTAGCCTGGAAGAACCCGA CTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATC CTGCTGCACGCCTTCCGGATCAGAGCCGTGA CCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGC CTCCTGA	
3	$(G_4S)_3$	G_4Sリンカー
4	（EAAAK）3	EAAAKリンカー
5	$(G_4S)_n$	G_4Sリンカー
6	（EAAAK）n	EAAAKリンカー
7	MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY CKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS APT SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP KLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTL	TFRC_G4S_IL-2
8	MLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLG MFQLFHLQKETG GGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT	FasL_G4S_IL-2
9	MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY CKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS IWE LKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEED GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQ YTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILK	TFRC_G4S_IL-12

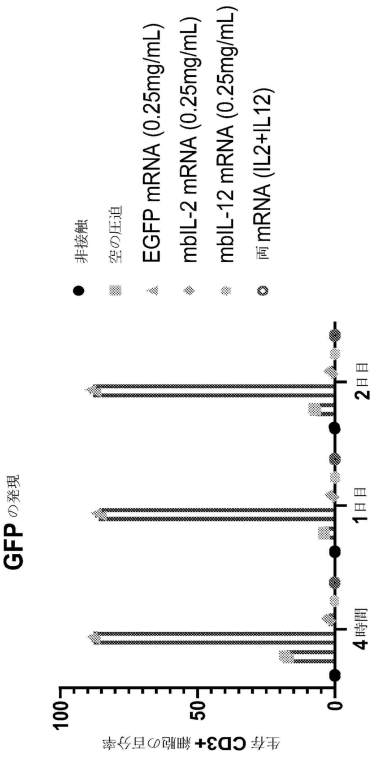
	DQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV RGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVM VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNA SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID ELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	
10	MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY CKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS CDL PQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRH DFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRIT LYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQ ESLRSKE	TFRC __G4S __IFN －a2a
11	MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGY CKSSDGPGETG	TFRC ドメイン
12	MLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLG MFQLFHLQKETG	FasL ドメイン

【図面】

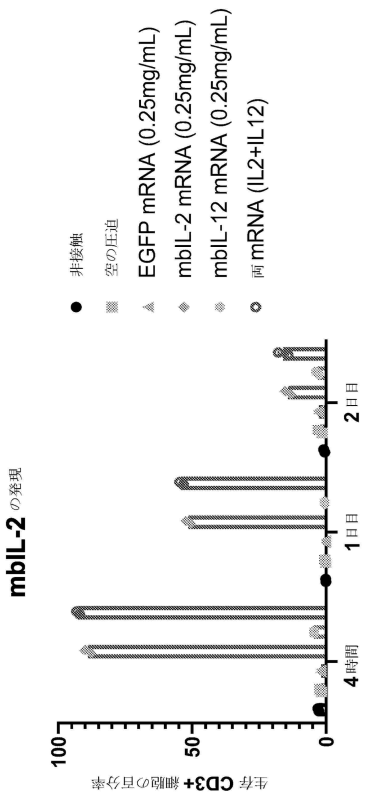
【図１Ａ】



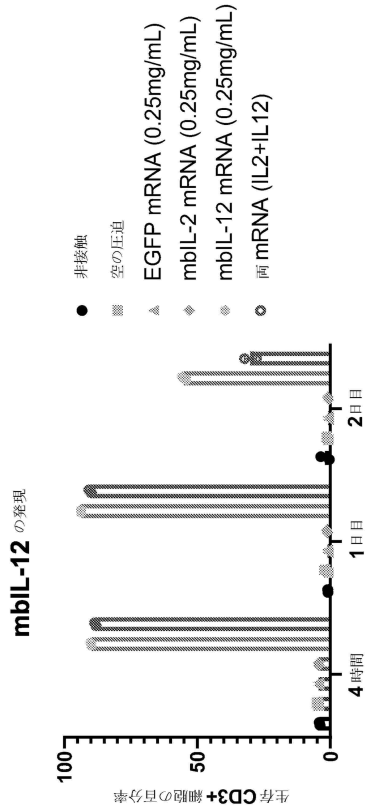
【図１Ｂ】



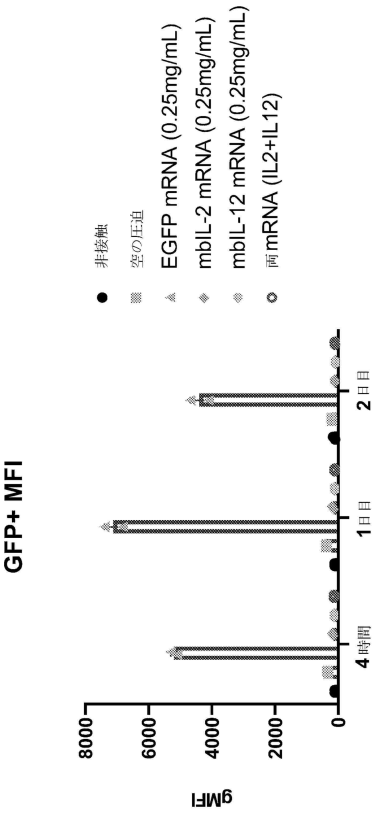
【図１Ｃ】



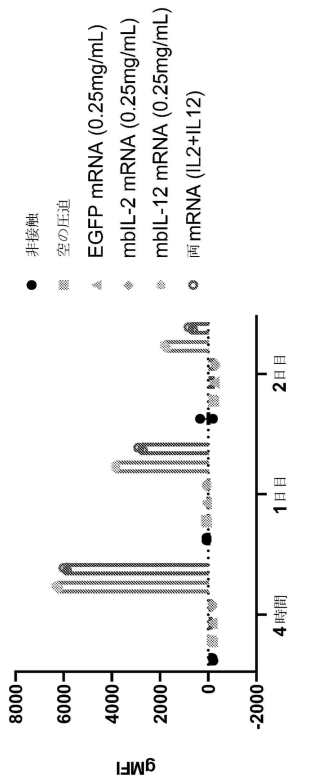
【図１Ｄ】



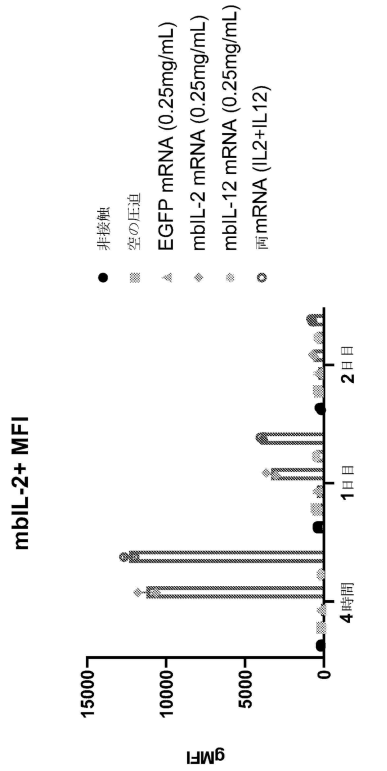
【図２Ａ】



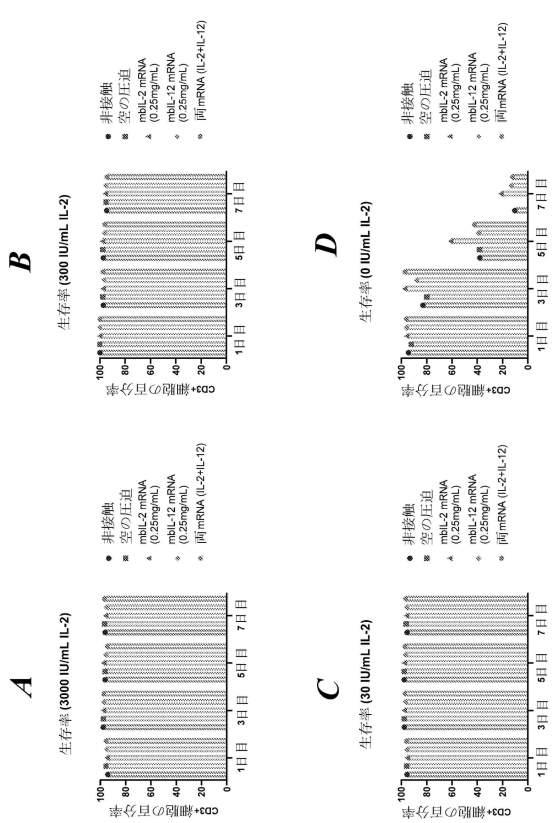
【図２Ｂ】



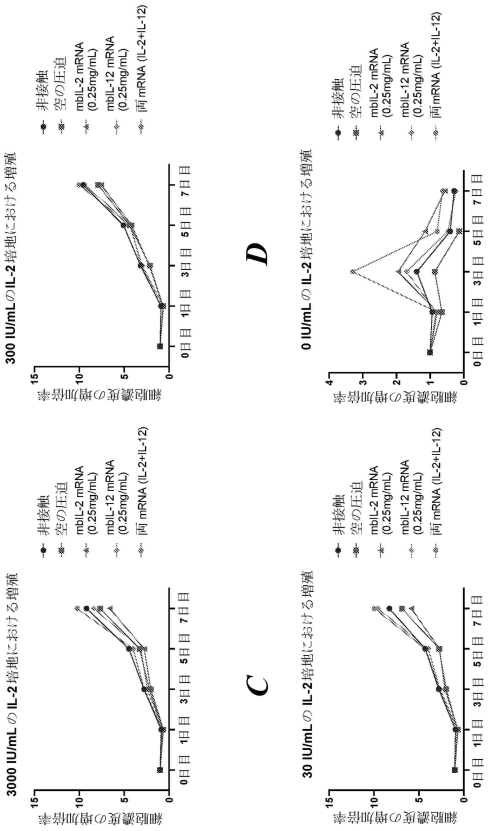
【図２Ｃ】



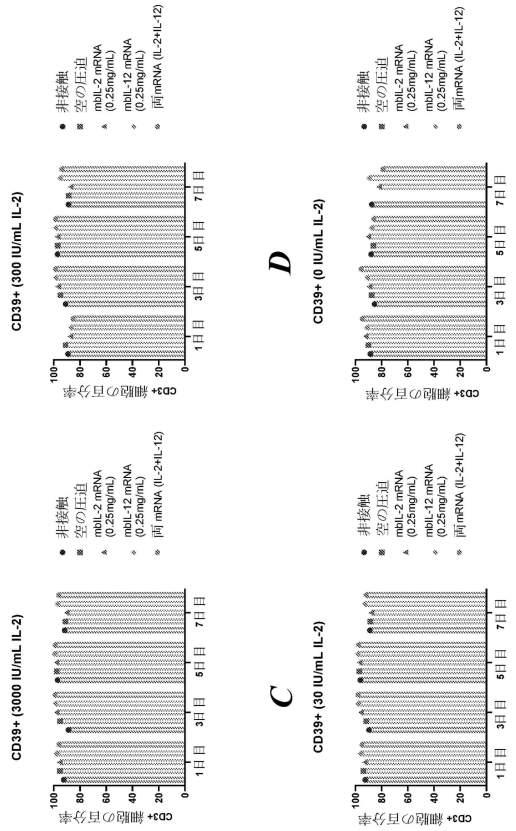
【図３】



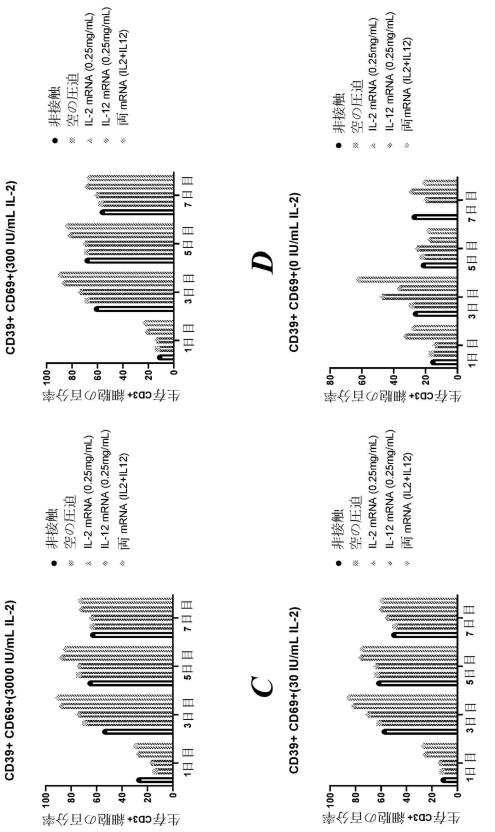
【図４】


A
3000 IU/mL の IL-2 培地における増殖
細胞濃度の増加倍率
0日目 1日目 3日目 5日目 7日目
非接触
空の圧迫
mbIL-2 mRNA (0.25mg/mL)
mbIL-12 mRNA (0.25mg/mL)
両 mRNA (IL-2+IL-12)
B
300 IU/mL の IL-2 培地における増殖
C
30 IU/mL の IL-2 培地における増殖
D
0 IU/mL の IL-2 培地における増殖

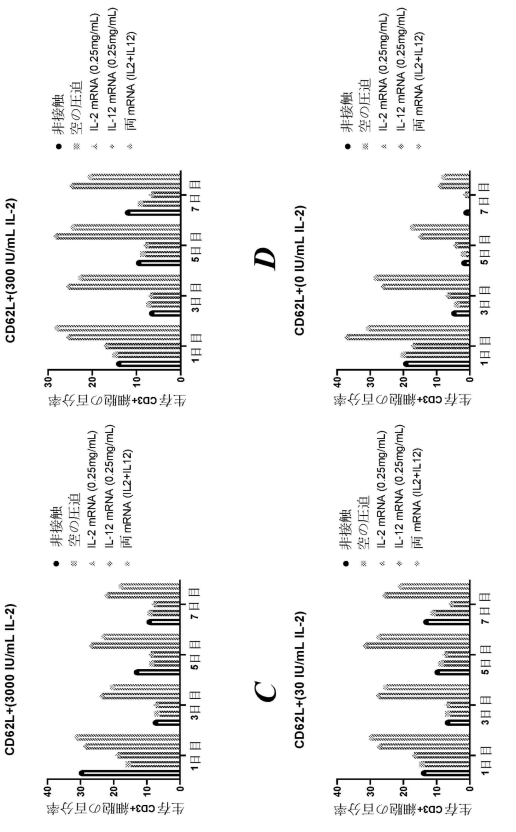
【図５】


A
CD39+ (3000 IU/mL IL-2)
cd3+ 細胞の百分率
1日目 3日目 5日目 7日目
非接触
空の圧迫
mbIL-2 mRNA (0.25mg/mL)
mbIL-12 mRNA (0.25mg/mL)
両 mRNA (IL-2+IL-12)
B
CD39+ (300 IU/mL IL-2)
C
CD39+ (30 IU/mL IL-2)
D
CD39+ (0 IU/mL IL-2)

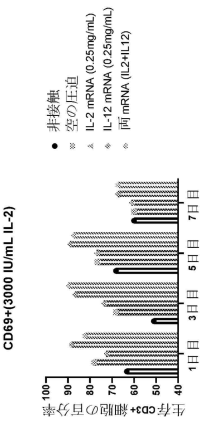
【図６】


A
CD39+ CD69+(3000 IU/mL IL-2)
生存 cd3+ 細胞の百分率
1日目 3日目 5日目 7日目
非接触
空の圧迫
IL-2 mRNA (0.25mg/mL)
IL-12 mRNA (0.25mg/mL)
両 mRNA (IL2+IL12)
B
CD39+ CD69+(300 IU/mL IL-2)
C
CD39+ CD69+(30 IU/mL IL-2)
D
CD39+ CD69+(0 IU/mL IL-2)

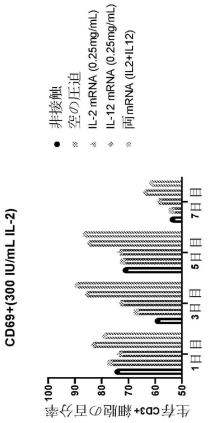
【図７】


A
CD62L-+(3000 IU/mL IL-2)
生存 cd3+ 細胞の百分率
1日目 3日目 5日目 7日目
非接触
空の圧迫
IL-2 mRNA (0.25mg/mL)
IL-12 mRNA (0.25mg/mL)
両 mRNA (IL2+IL12)
B
CD62L-+(300 IU/mL IL-2)
C
CD62L-+(30 IU/mL IL-2)
D
CD62L-+(0 IU/mL IL-2)

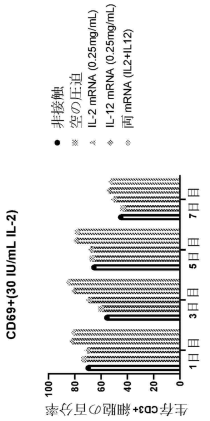
【図８Ａ】



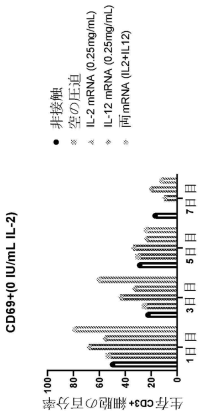
【図８Ｂ】



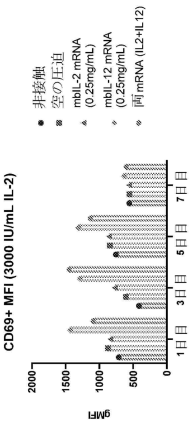
【図８Ｃ】



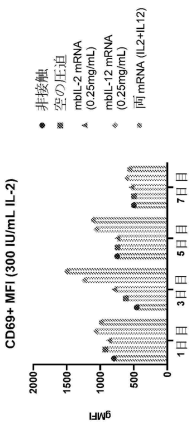
【図８Ｄ】



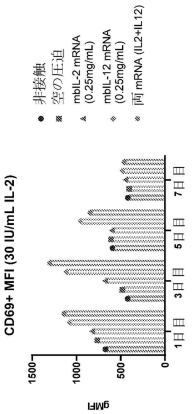
【図８Ｅ】



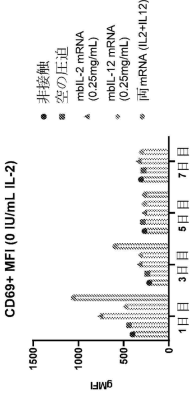
【図８Ｆ】



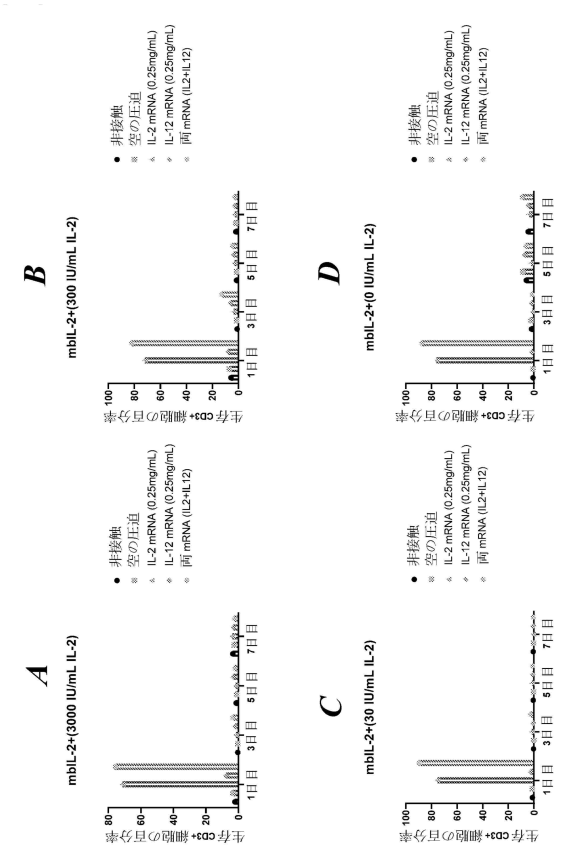
【図８Ｇ】



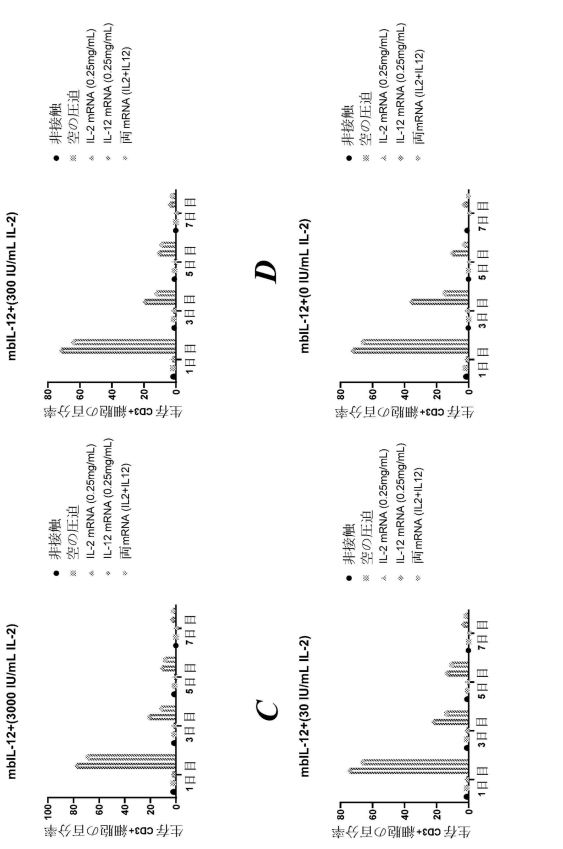
【図８Ｈ】



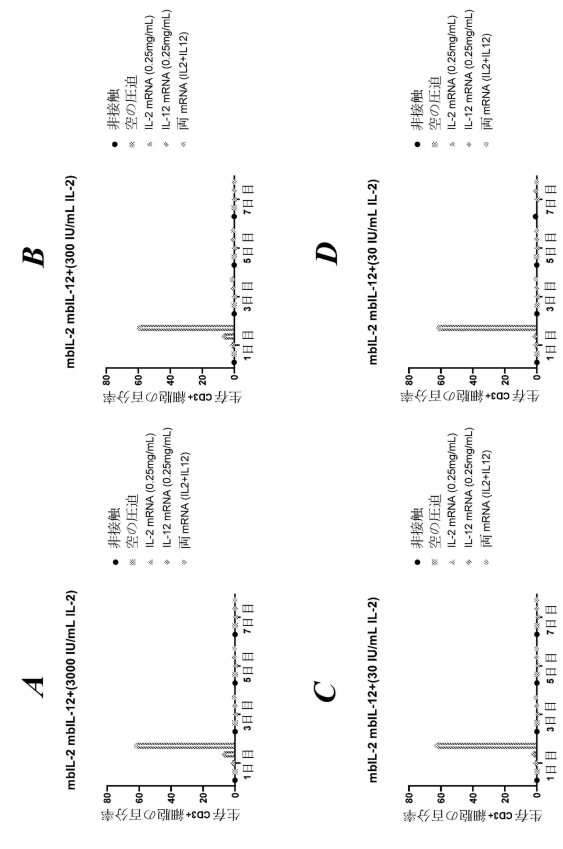
【図９】



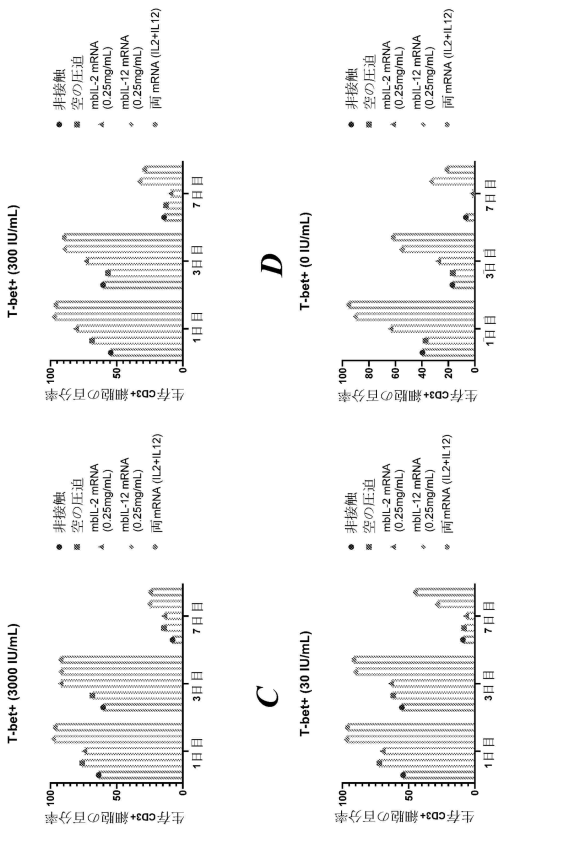
【図１０】



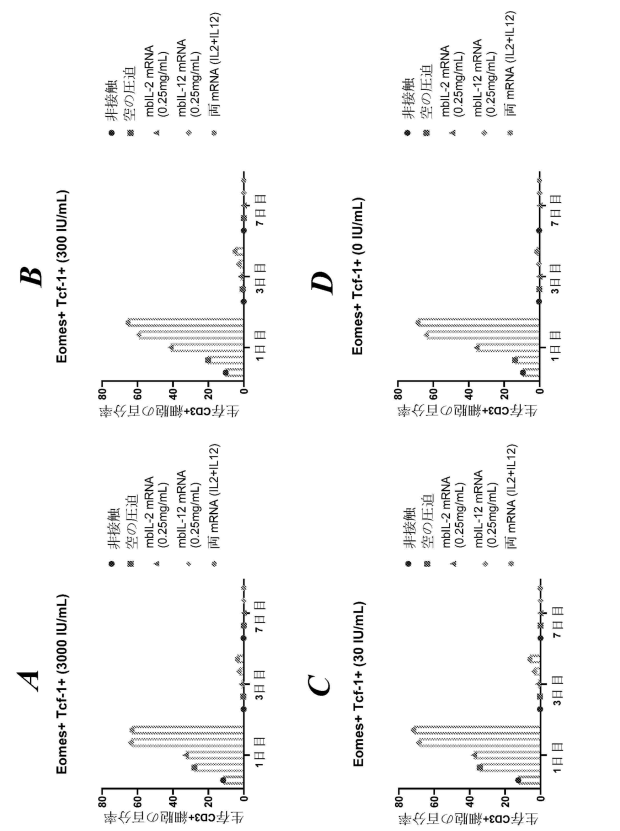
【図１１】



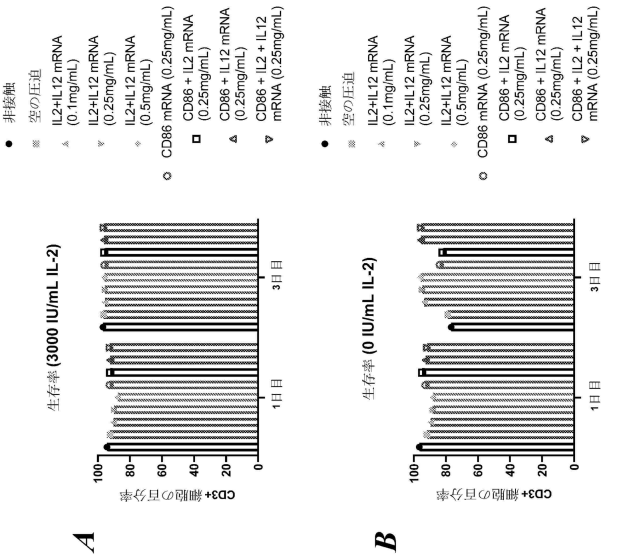
【図１２】



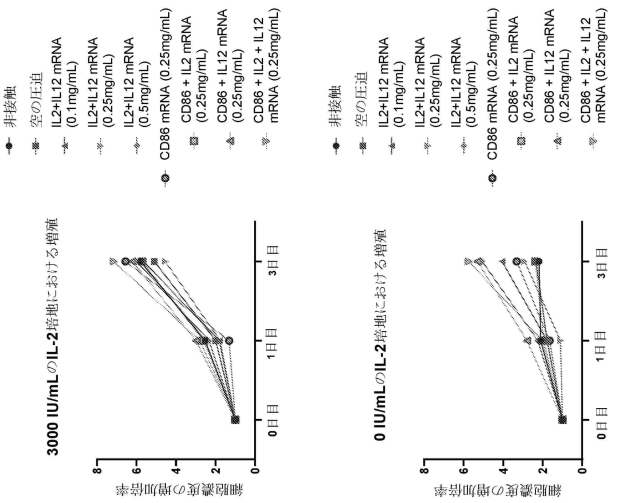
【図１３】



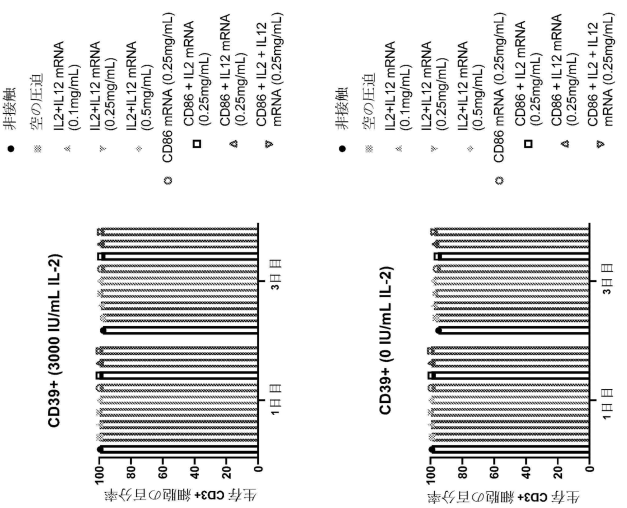
【図１４】



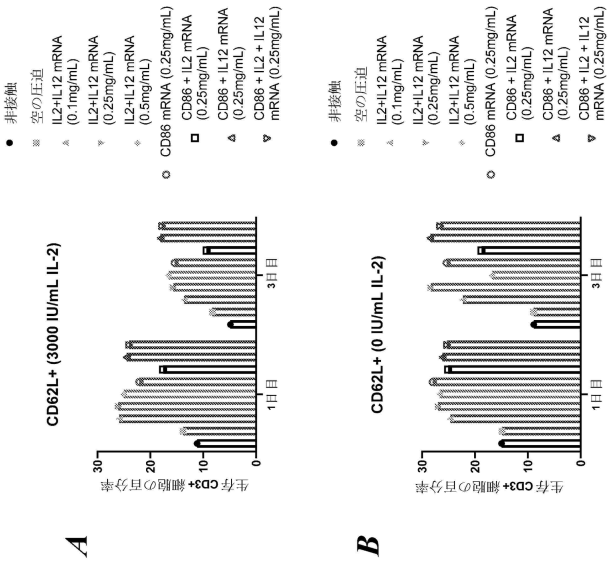
【図１５】



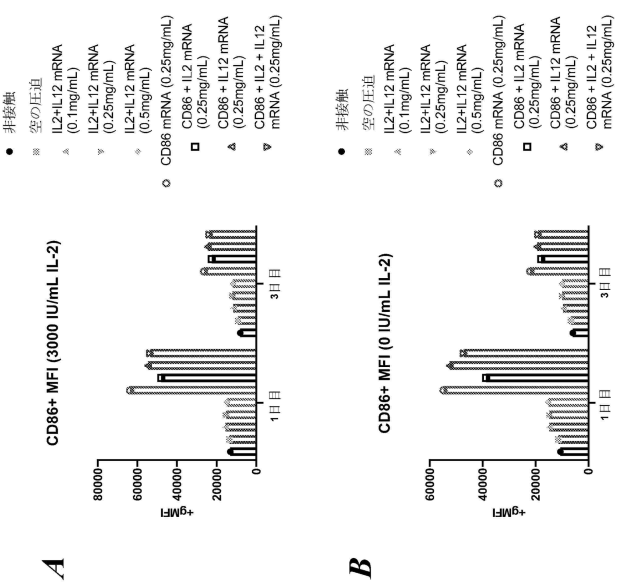
【図１６】



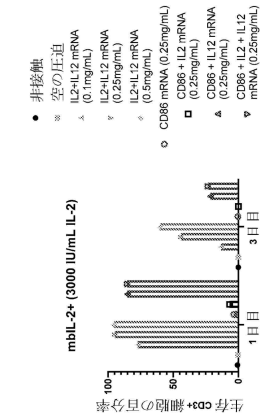
【図１７】



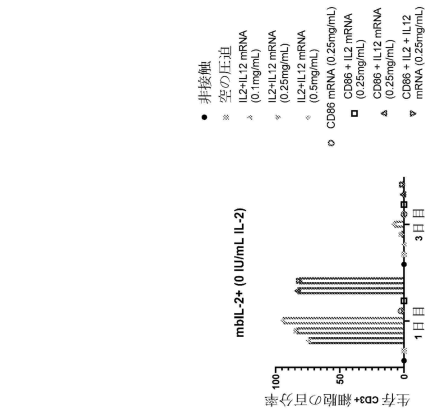
【図１８】



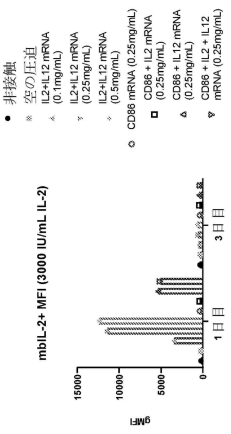
【図１９Ａ】



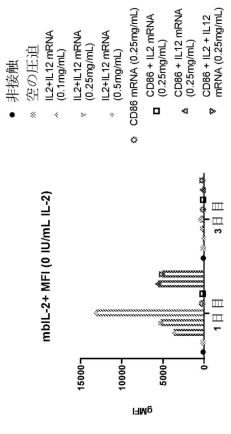
【図１９Ｂ】



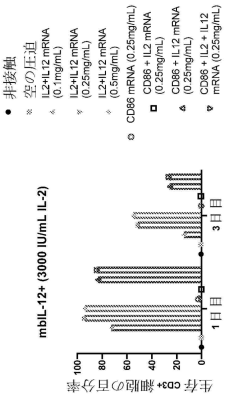
【図１９Ｃ】



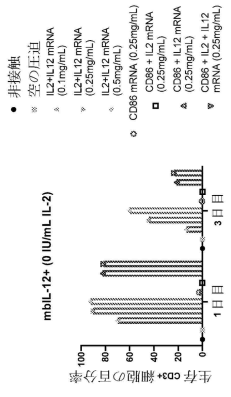
【図１９Ｄ】



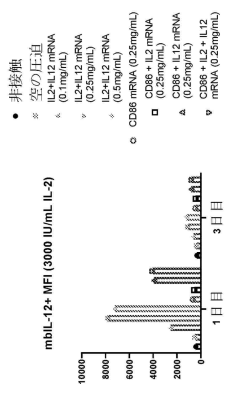
【図２０Ａ】



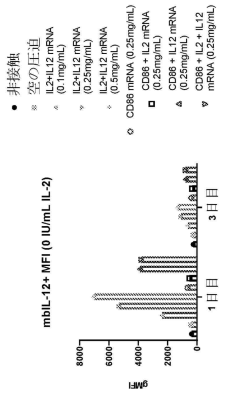
【図２０Ｂ】



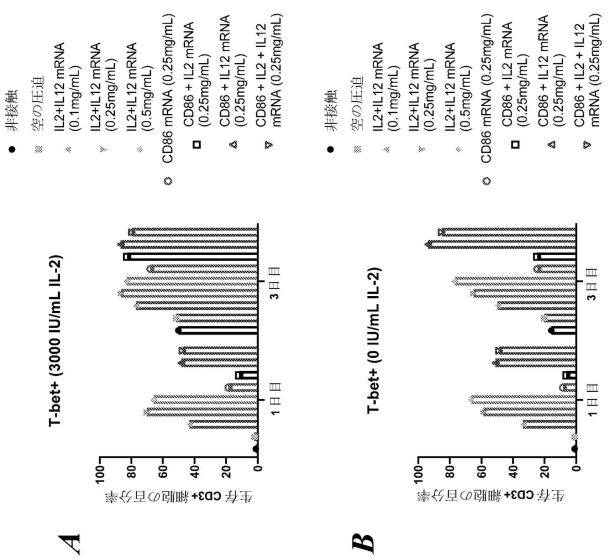
【図２０Ｃ】



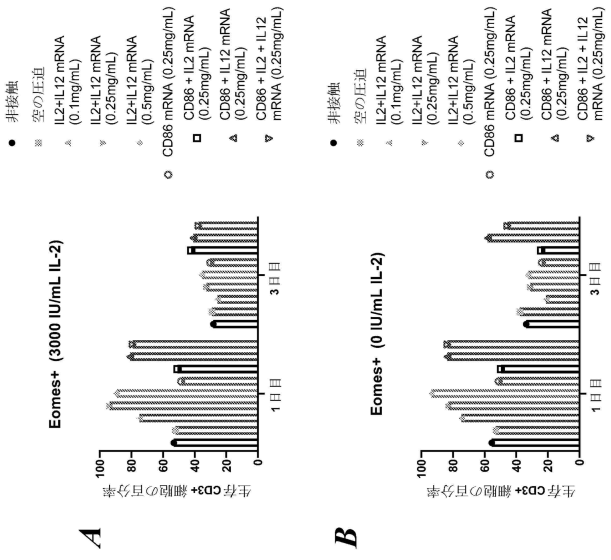
【図２０Ｄ】



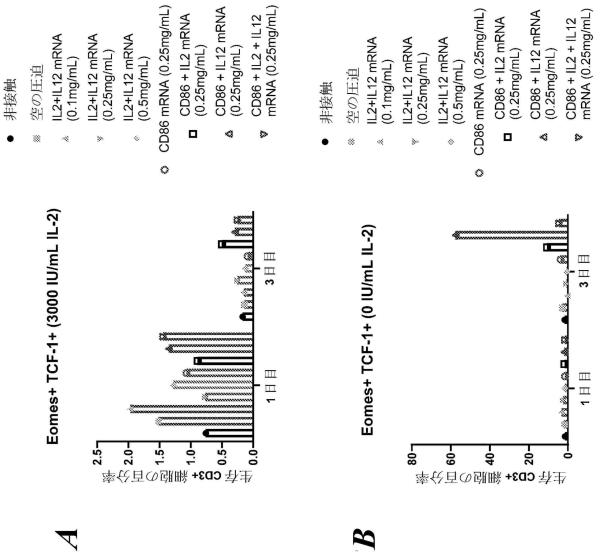
【図２１】



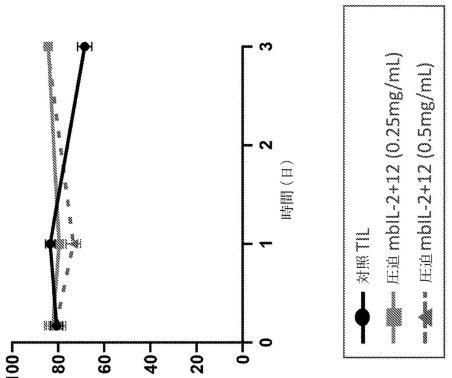
【図２２】



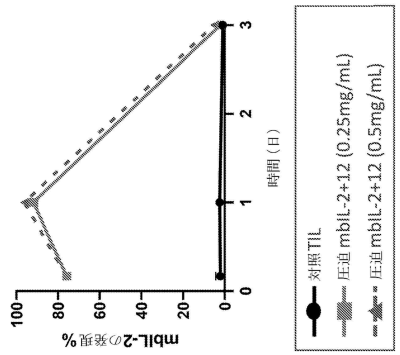
【図２３】



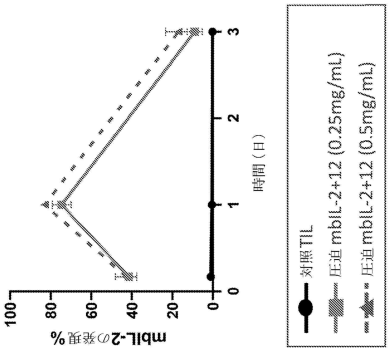
【図２４Ａ】



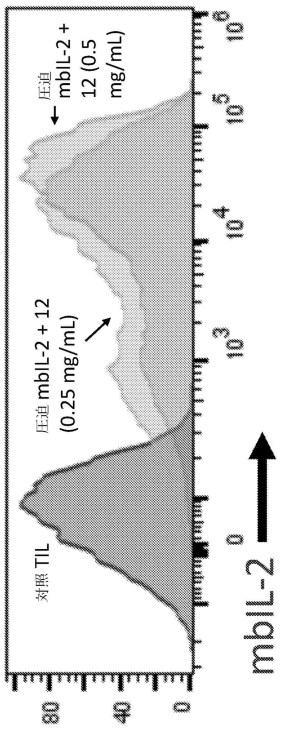
【図２４Ｂ】



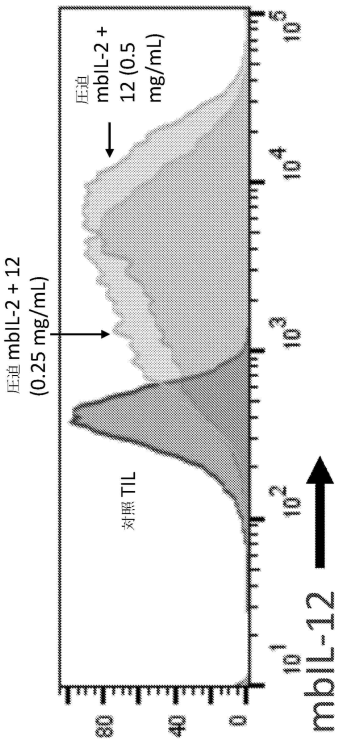
【図２４Ｃ】



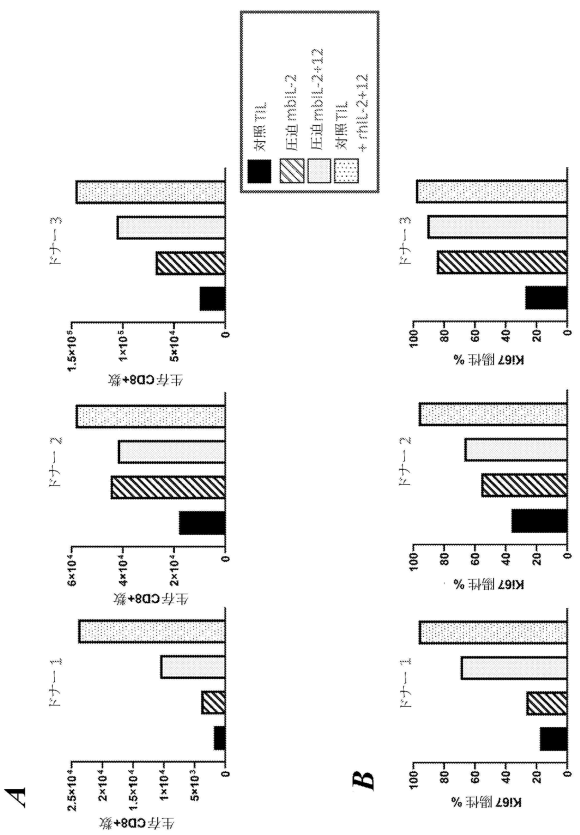
【図２４Ｄ】



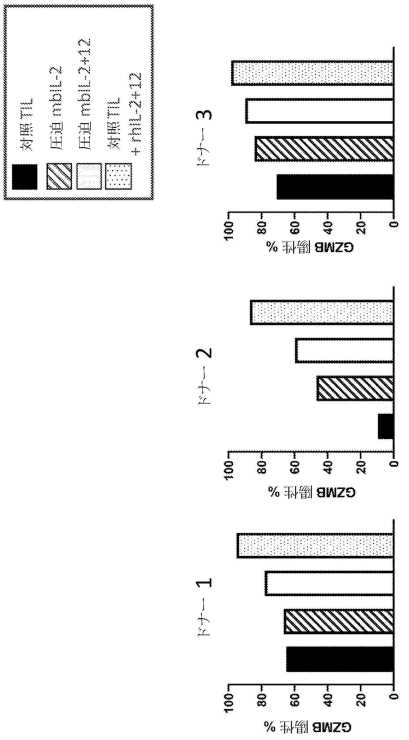
【図２４Ｅ】



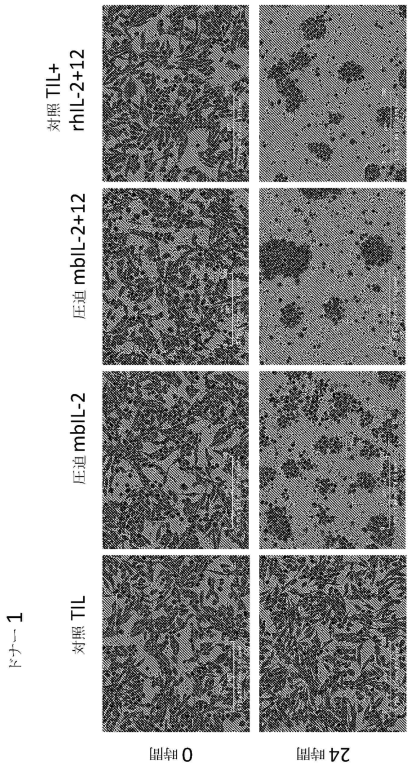
【図２５】



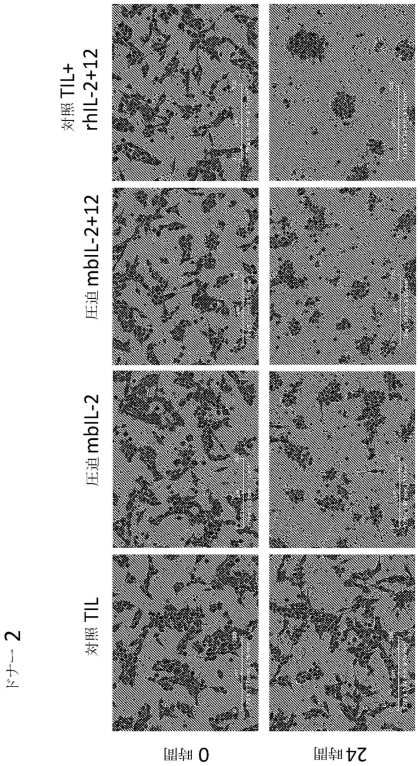
【図２６】



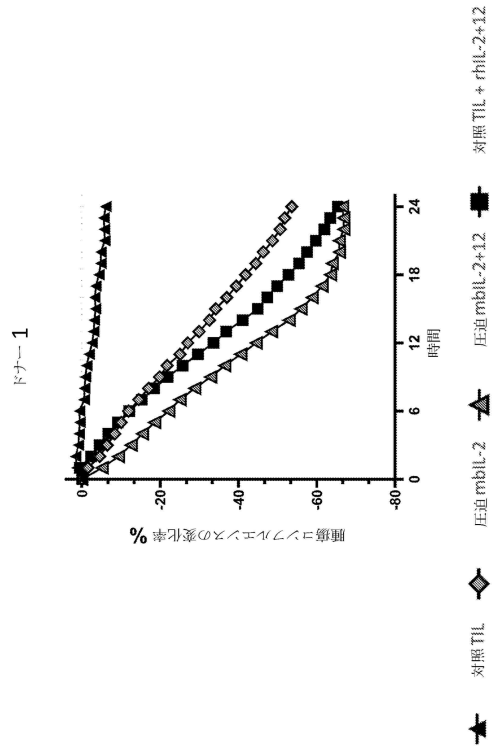
【図２７Ａ】



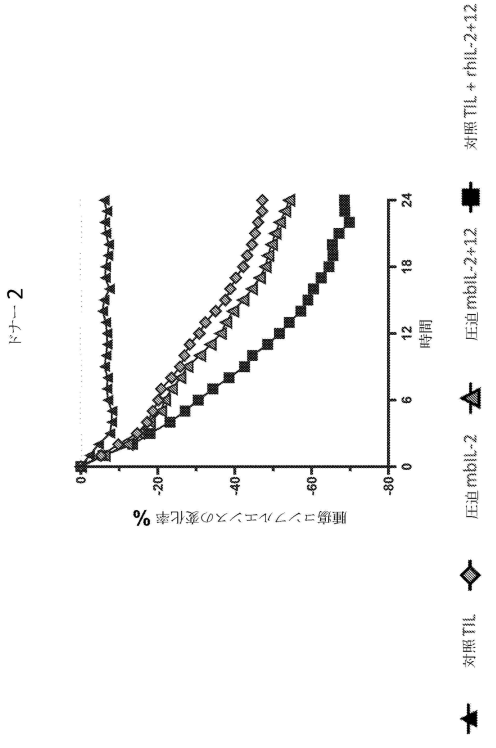
【図２７Ｂ】



【図２７Ｃ】



【図２７Ｄ】



【配列表】

2024545582000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 C12M1/42 C12N15/87 A61P35/00 C07K14/54
A61K35/17 A61K38/20 A61K39/00 C12N5/0781 A61K35/00
A61K48/00 C07K14/47 C07K14/705
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)
C12N C12M A61K A61P C07K

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)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L. ZHANG ET AL: "Tumor-Infiltrating Lymphocytes Genetically Engineered with an Inducible Gene Encoding Interleukin-12 for the Immunotherapy of Metastatic Melanoma", CLINICAL CANCER RESEARCH, 18 February 2015 (2015-02-18), XP055185303, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2085	1-4,10
Y	the whole document Materials and methods	1-19
X	WO 2021/061832 A1 (UNIV MINNESOTA [US]) 1 April 2021 (2021-04-01)	1-6,10
Y	paragraph [0153] - paragraph [0155] claims 1, 67, 101	1-19

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
3 March 2023	14/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Martin

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/079843

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GHEBEH H ET AL: "The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-stimulatory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors", NEOPLASIA, NEOPLASIA PRESS, ANN ARBOR, MI, US, vol. 8, no. 3, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 190-198, XP008091677, ISSN: 1522-8002, DOI: 10.1593/NEO.05733 the whole document page 193 table 1 Materials and methods -----	1-19
Y	US 2021/069248 A1 (ELPEK KUTLU GOKSU [US] ET AL) 11 March 2021 (2021-03-11) examples 5-7 claims 55-75 -----	1-19
Y	CHARO JEHAD ET AL: "Bcl-2 Overexpression Enhances Tumor-Specific T-Cell Survival", CANCER RESEARCH , vol. 65, no. 5 1 March 2005 (2005-03-01), pages 2001-2008, XP055978837, 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2006 Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/65/5/2001/2540662/2001-2008.pdf the whole document Materials and methods -----	1-19
Y	Anonymous: "SQZ Biotech Presents Preclinical Data on its mRNA-based enhanced APCs and the Potential of the SQZ APC Platform in KRAS Driven Tumors", , 10 April 2021 (2021-04-10), XP055979333, Retrieved from the Internet: URL:https://www.businesswire.com/news/home/20210410005002/en/SQZ-Biotech-Presents-Preclinical-Data-on-its-mRNA-based-enhanced-APCs-and-the-Potential-of-the-SQZ-APC-Platform-in-KRAS-Driven-Tumors [retrieved on 2022-11-09] the whole document -/--	1-19

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& Ilker Ozay Emrah ET AL: "Enhancing Potency of Antigen Presenting Cells via Signal 2/3 mRNA Engineering through Cell Squeeze Technology", , 1 April 2021 (2021-04-01), XP055979357, Retrieved from the Internet: URL:https://s26.q4cdn.com/867116262/files/AACR-2021-eAPC-Poster-E.-I.-Ozay-FINAL.pdf [retrieved on 2022-11-09] the whole document	
Y	WO 2020/072833 A1 (SQZ BIOTECHNOLOGIES CO [US]) 9 April 2020 (2020-04-09) paragraph [0122] paragraph [0185] paragraph [0210] example 9 claims 43-49	1-19
X,P	WO 2022/165260 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; ZHANG YONGLIANG; CUBAS RAFAEL) 4 August 2022 (2022-08-04) example 13 paragraph [2943] - paragraph [2944] figure 37	1-19
E	WO 2023/010090 A1 (SQZ BIOTECHNOLOGIES CO [US]; MALONEY MICHAEL FINNAN [US] ET AL.) 2 February 2023 (2023-02-02) the whole document paragraph [382ff] paragraph [448ff]	1-19
T	DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1 September 2022 (2022-09-01), SILVER R J ET AL: "Tumor infiltrating lymphocytes expressing membrane-bound IL-2 and IL-12 exhibit enhanced proliferation, function, and persistence without requiring exogenous IL-2 support", XP002807935, Database accession no. EMB-002020168610 abstract -/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/079843

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	& SILVER R J ET AL: "Tumor infiltrating lymphocytes expressing membrane-bound IL-2 and IL-12 exhibit enhanced proliferation, function, and persistence without requiring exogenous IL-2 support", ANNALS OF ONCOLOGY - ABSTRACT BOOK OF THE ESMO CONGRESS 2022, 9 - 13 SEPTEMBER 2022 20220901 ELSEVIER LTD NLD, vol. 33, no. Supplement 7, 1 September 2022 (2022-09-01), ISSN: 0923-7534 the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/079843

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021061832 A1	01-04-2021	AU 2020355025 A1	07-04-2022
		CA 3151690 A1	01-04-2021
		CN 115175987 A	11-10-2022
		EP 4034640 A1	03-08-2022
		JP 2022548315 A	17-11-2022
		US 2022282285 A1	08-09-2022
		WO 2021061832 A1	01-04-2021
US 2021069248 A1	11-03-2021	AU 2020345943 A1	31-03-2022
		CA 3150224 A1	18-03-2021
		CN 114651003 A	21-06-2022
		EP 4028413 A1	20-07-2022
		JP 2022547154 A	10-11-2022
		US 2021069248 A1	11-03-2021
		US 2022332780 A1	20-10-2022
		WO 2021050789 A1	18-03-2021
WO 2020072833 A1	09-04-2020	CA 3115245 A1	09-04-2020
		CN 113165866 A	23-07-2021
		EP 3860945 A1	11-08-2021
		JP 2022512593 A	07-02-2022
		KR 20210070338 A	14-06-2021
		US 2021388390 A1	16-12-2021
		WO 2020072833 A1	09-04-2020
WO 2022165260 A1	04-08-2022	NONE	
WO 2023010090 A1	02-02-2023	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P	*31/12*	*(2006.01)*	A61P	31/12	
C12N	*15/24*	*(2006.01)*	C12N	15/24	
C12N	*15/26*	*(2006.01)*	C12N	15/26	

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,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100191086
弁理士 高橋 香元

(72)発明者 マロニー，マイケル フィナン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 オゼイ，エムラー イルカー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 ロウヘッド，スコット マックナブ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 シルバー，レベッカ ジーン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 ブラーテ，アシュリー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 シルバ，ムリーリョ
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 ギルバート，ジョナサン ビー．
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 ブリッゲン，デビン
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２４７２，ウォータータウン，２００ アーセナル ヤーズ ブールバード，エスキューゼット バイオテクノロジーズ カンパニー内

(72)発明者 タールホファー，コリン ジョセフ
アメリカ合衆国，オレゴン州 ９７２１３，ポートランド，４８０５ エヌイー グリサン ストリート ２エヌ３５，アゴンオックス，インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考） 4B065 AA93Y AA94X AB01 AC14 BA01 BB19 BB31 BB34 BD50 CA23 CA24 CA33 CA44
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 BB65 NA14 ZB26 ZB33