

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6895959号
(P6895959)

(45) 発行日 令和3年6月30日(2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月10日(2021.6.10)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C O 7 K 14/725 (2006.01)

C O 7 K 14/715 (2006.01)

C 1 2 N 5/0783 Z N A

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 15/13

C O 7 K 14/725

C O 7 K 14/715

請求項の数 53 (全 230 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-521024 (P2018-521024)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月20日(2016.10.20)
 (65) 公表番号 特表2018-531035 (P2018-531035A)
 (43) 公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2016/001618
 (87) 国際公開番号 W02017/068421
 (87) 国際公開日 平成29年4月27日(2017.4.27)
 審査請求日 令和1年10月16日(2019.10.16)
 (31) 優先権主張番号 62/245, 261
 (32) 優先日 平成27年10月22日(2015.10.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/245, 252
 (32) 優先日 平成27年10月22日(2015.10.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 514214106
 ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ
 ーハー
 ドイツ連邦共和国 81675 ミュンヘ
 ン グリルパーザーシュトラッセ 10
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を培養するための方法ならびにそのためのキットおよび装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) T細胞を含む組成物を、一価抗体断片を含む受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程であって、該受容体結合物質が、(i)該受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)該組成物中のT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の分子に特異的に結合する工程；および

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

【請求項 2】

分子が、TCR/CD3複合体の構成成分であるか、またはCD3である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

受容体結合物質が、結合パートナーを含み、かつ、試薬の複数の結合部位が、各々が結合パートナーに結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記破壊が、試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、

該試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質が、競合物質であり、受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する該物質の結合親和性が、受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する受容体結合物質の結合親和性より高い、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記破壊が、試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、該物質が遊離した結合パートナーである、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】

受容体結合物質が第1の受容体結合物質であり、前記分子が第1の分子であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の結合が、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

試薬が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、それによって、第2の受容体結合物質が該試薬に可逆的に結合されており、該第2の受容体結合物質が一価抗体断片を含む、請求項6または請求項7に記載の方法。

【請求項9】

第2の受容体結合物質が、結合パートナーを含み、かつ、試薬の複数の結合部位が、各々が結合パートナーに結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位を含み、それによって、第1および第2の受容体結合物質が、2つ以上の結合部位を介して試薬に可逆的に結合されている、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記破壊が、試薬から第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、

該試薬から第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質を解離させることができる物質が、競合物質であり、試薬の複数の結合部位に対する該物質の結合親和性が、(i) 第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する第1の受容体結合物質、および、(ii) 第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する第2の受容体結合物質、の結合親和性より高い、請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】

前記破壊が、試薬から第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、該物質が遊離した結合パートナーである、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】

以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) T細胞を含む組成物を、

(i) T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式で、T細胞の表面上に発現している第1の分子に特異的に結合する、第1の受容体結合物質；および

(ii) (i) 第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) T細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合する、一価抗体断片を含む第2の受容体結合物質

の存在下でインキュベートする工程；ならびに

10

20

30

40

50

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

【請求項13】

第2のシグナルが、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後30分を超えてから実行される、請求項12または請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後1時間～4日、前記インキュベーションの開始後6時間～3日、前記インキュベーションの開始後12時間～2日、もしくは前記インキュベーションの開始後1日～3日に実行される；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後1時間もしくはそれを超えてから、前記インキュベーションの開始後1日、2日、3日、もしくは4日以内に、実行される、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；または

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリ分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、請求項6～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

第2の分子が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、請求項6～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

第2の分子がCD28である、請求項6～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

第1の分子がCD3であり、第2の分子がCD28である、請求項6～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

第2の受容体結合物質が、結合パートナーを含み、かつ、複数の結合部位が、各々が結合パートナーに結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位を含む、請求項12～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記破壊が、試薬から第2の受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、

該試薬から第2の受容体結合物質を解離させることができる物質が、競合物質であり、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する該物質の結合親和性が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる試薬の複数の結合部位に対する第2の受容体結合物質の結合親和性より高い、請求項12～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記破壊が、試薬から第2の受容体結合物質を解離させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含み、ここで、該物質が遊離した結合パートナーである、請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

前記破壊の後、T細胞を含む組成物をさらにインキュベートする工程を含む、請求項1～

10

20

30

40

50

23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

インキュベーションおよびさらなるインキュベーションが、同じ容器において実行され；かつ／または

さらなるインキュベーションが、前記試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質の存在下で実行され；かつ／または

前記方法が、前記試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質、受容体結合物質、第2の受容体結合物質、および／もしくは試薬を、さらなるインキュベーションの前に細胞組成物から除去する工程を含まず；かつ／または

インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で実行され；かつ／または

インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、

請求項24に記載の方法。

【請求項 2 6】

インキュベーションまたはさらなるインキュベーションが、T細胞、CD4+ T細胞、および／またはCD8+ T細胞の増殖を増強または誘導することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、請求項24または請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

さらなる作用物質が、IL-2、IL-15、およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 8】

さらなるインキュベーションが、14日を超えない、12日を超えない、10日を超えない、8日を超えない、または6日を超えない期間にわたって実行される、請求項24～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

T細胞が、対象由来の初代細胞である、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

T細胞が、分画されていないT細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD3+ T細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD4+ T細胞である、または、濃縮されたかもしくは単離されたCD8+ T細胞である、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

T細胞が、ヒト細胞である、請求項1～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

試薬が、前記インキュベーションの間、固体支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁性粒子、および／もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合されていないかもしくはそれらと会合しておらず；または

試薬が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体に結合されており、それによって、複数のT細胞が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体上に可逆的に固定化されている、

請求項1～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

試薬が、柔軟性であり、金属もしくは磁性コアを含有せず、完全にもしくは主に有機多量体から構成されており、球形ではなく、実質的に球形もしくは均一な形状ではなく、かつ／もしくは硬直していない、請求項1～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

一価抗体断片が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

第1の受容体結合物質が抗CD3 Fabであり、第2の受容体結合物質が抗CD28 Fabである、

10

20

30

40

50

請求項6～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

試薬が、
 ビオチン、ビオチン類似体、もしくはそれらの生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、
 ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンのムテイン、
 ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン、
 遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬、
 オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質、
 グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質、
 カルモジュリンもしくはその類似体、
 カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質、
 FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質、
 HAタグに結合することができる作用物質、
 マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質、
 HSVエピトープに結合することができる作用物質、
 mycエピトープに結合することができる作用物質、または
 ビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質
 であるか、あるいはそれを含む、請求項1～35のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

試薬が、
 ビオチンもしくは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンのムテイン、
 ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジンもしくはアビジンのムテイン、
 遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬、
 オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質、
 グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質、
 カルモジュリンもしくはその類似体、
 カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質、
 FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質、
 HAタグに結合することができる作用物質、
 マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質、
 HSVエピトープに結合することができる作用物質、
 mycエピトープに結合することができる作用物質、または
 ビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質
 の、オリゴマーまたはポリマーである、請求項1～36のいずれか一項に記載の方法。

20

30

【請求項 3 8】

試薬が、ストレプトアビジンムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、請求項1～37のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 9】

オリゴマーまたはポリマーの個々の分子が、多糖または二官能性リンカーによって架橋されている、請求項37または38に記載の方法。

【請求項 4 0】

試薬が、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むストレプトアビジンムテインを含む；または
 ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

50

請求項1～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

ストレプトアビジンムテインが、

(a)SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；または

(b)SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列を含む、請求項36～40のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項42】

試薬が、ストレプトアビジンムテインであるかまたはそれを含み；かつ

結合パートナーが、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

20

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを含む、

請求項3～11および21～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

試薬が、ストレプトアビジンムテインであるかまたはそれを含み、かつ、結合パートナーが、SEQ ID NO: 15～19のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含むストレプトアビジン結合ペプチドを含む、請求項3～11および21～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

試薬が、ストレプトアビジンムテインまたはそれらの生物学的に活性な断片であるか、またはそれを含み；かつ

試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、D-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、

請求項4～11および22～43のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項45】

試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質が、D-ビオチンまたはデスチオビオチンを含む、請求項4～11および22～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質が、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

40

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドである、

請求項44または45に記載の方法。

【請求項47】

50

試薬から受容体結合物質を解離させることができる物質が、SEQ ID NO:15～19のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含むストレプトアビジン結合ペプチドである、請求項44または45に記載の方法。

【請求項48】

インキュベーションの前に、前記方法が、細胞を、組成物のT細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質と接触させ、それによってT細胞を含む組成物を生成もしくは取得することを含む；または

インキュベーションの少なくとも一部が、さらに、組成物のT細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質の存在下で実行され、培養T細胞が、マーカーを含むT細胞または標的細胞について濃縮される、

請求項1～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位をさらに含む試薬に可逆的に結合されている；または

選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位を含むさらなる試薬に可逆的に結合されている、

請求項48に記載の方法。

【請求項50】

シグナルの誘導またはモジュレーションが、シグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、培養T細胞の増大および／または活性化における増加をもたらす、請求項1～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが可逆的結合を破壊せずに、または、インキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のT細胞と各々比較して、組成物中のT細胞の増大および／もしくは増殖を増加させる、組成物中のT細胞の代謝プロファイルを変更する、組成物中のCD8+ T細胞のサブセットを変更し；かつ／または、組成物中の長命メモリーT細胞のパーセンテージを増加させる、請求項1～50のいずれか一項に記載の方法。

【請求項52】

組成物のT細胞に組換え核酸分子を導入する工程をさらに含み、核酸分子が組換えタンパク質をコードし、それによって、細胞が組換えタンパク質を発現する、請求項1～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

組換えタンパク質が、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体（TCR）である、請求項52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、「Methods for Culturing Cells and Kits and Apparatus for Same」という名称の、2015年10月22日付で出願された米国仮出願第62/245,252号、および「Methods for Culturing Cells and Kits and Apparatus for Same」という名称の、2015年10月22日付で出願された米国仮出願第62/245,261号からの優先権を主張するものであり、それらの各々の内容は参照によりその全体が組み入れられる。

【0002】

配列表の参照による組み入れ

本出願は、電子フォーマットの配列表とともに出願される。配列表は、サイズが132,710バイトの、2016年10月20日に作成された735042003640SeqList.txtという名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットの情報は、参照によりその全体が組み入れ

10

20

30

40

50

られる。

【0003】

分野

本開示は、いくつかの局面において、リンパ球の集団のような細胞の組成物の、増大(増殖)の刺激、活性化、同時刺激および/または生存を誘導するためなどの、インキュベーションまたは培養に関する。いくつかの局面において、本開示は、細胞の表面上の分子への作用物質の結合と、それによって細胞に1つまたは複数のシグナルを提供することを伴う細胞集団の、例えば増大(増殖)、生存もしくは持続性の、刺激、活性化、同時刺激、または他の効果のための方法および試薬を提供する。場合によっては、試薬は、多量体形成試薬のような、作用物質のための複数の結合部位を含む試薬であり、したがって1つまたは複数の作用物質は、試薬に可逆的に結合することにより多量体化され、例えば、それによって、その上で多量体化された刺激物質を有する、刺激試薬(多量体化作用物質)を生成する。いくつかの局面において、多量体化作用物質は、細胞の集団の増大もしくは増殖または他の刺激を提供することができ、その後、そのような刺激物質は、可逆的結合の破壊によって除去することができる。組成物、装置およびその使用の方法も提供される。

10

【背景技術】

【0004】

背景

そのようなT細胞の注入が腫瘍担持宿主において抗腫瘍反応性を有することが示されている養子細胞免疫療法もしくはがん療法用に、またはウイルス感染の処置用にインビトロで抗原特異的T細胞を増大するためになど、インビトロでT細胞集団を刺激するためにさまざまな戦略が利用可能である。研究、診断および治療目的のためになど、インビトロで細胞集団を増大するために改善された戦略が必要とされる。そのような必要性を満たす試薬、方法、製品およびキットが提供される。

20

【発明の概要】

【0005】

概要

標的細胞におけるシグナルを誘導またはモジュレートするための可逆的試薬を用いて、細胞およびその組成物をインキュベートするための、例えばそのような細胞を培養するための方法が本明細書において提供される。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。

30

【0006】

いくつかの局面では、方法は、T細胞を含む組成物を、作用物質、例えば受容体結合物質、例えば刺激物質の存在下でインキュベートする工程を含む。受容体結合物質(例えば、刺激物質)は、受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に、可逆的に結合させることができる。いくつかの局面では、受容体結合物質は、例えば、組成物中のT細胞などの細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式で、T細胞などの細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる。いくつかの態様では、該方法は、特定の工程、特定の作用物質の選択および/または特定の試薬の選択などの特徴を含み、こうした特徴は、試薬を介して受信されたまたはモジュレートされたシグナルのタイプ、強度もしくは持続時間の、および/または該方法によって最終的に生成されたアウトプット組成物もしくは細胞集団(複数可)の特性の、制御または調整を可能にする。いくつかの態様では、そのような特徴は、例えば作用物質または試薬の個々の成分の結合の可逆性、それゆえに、多量体化された作用物質と細胞との結合の可逆性といった、作用物質と試薬との有利な特性のために可能である。このような試薬の特性は、多くの方法で制御を達成するために利用され得る。例えば、いくつかの態様では、該方法は、結合の可逆性を介して、シグナルの時間的制御を与えること、細胞と多量体化された作用物質とが接触する持続時間を制御すること、および/またはそれにより誘導されるシグナル伝達の持続時間を制御することを含む。

40

【0007】

50

いくつかの態様では、該方法は、そのような作用物質が細胞に結合している時間の長さの制御、例えば正確な制御を含む。例えば、これは、特定の時点で、ある場合には、生理学的温度でかつ/または様々な栄養素を用いてインキュベートするなどの、他の培養条件下でさらなる時間にわたって細胞をなおも維持している間に、そのような結合を積極的に逆転させることによって、行うことができる。したがって、細胞によって受信されたすべてのまたは実質的にすべてのシグナルの終結を含むだけの他の方法とは対照的に、提供された方法は、いくつかの局面では、特定の試薬によって送達されたシグナルの特異的な終結または妨害を可能にする。

【0008】

同様に、いくつかの態様では、可逆性は、試薬が本質的にモジュールであることを可能にし、例えば、結合を単純に逆転させ、可逆的結合が誘導される条件下で、追加の作用物質または試薬と組み合わせることによって、技術的操作または新たな試薬なしに、その1つ以上の成分の置換を可能にする。例えば、様々な刺激物質を、同じ多量体形成試薬に同時にまたは異なる時間に、可逆的に結合させることができることによって、提供された方法および組成物のユーザーは、1つ以上の刺激物質を別の1つ以上の刺激物質に置換して、それにより、例えば、所望の結果に応じて、より強い、より弱い、または質的に異なるシグナルを誘導することによって、送達される特定のシグナルの性質を調整することができる。

【0009】

いくつかの態様では、時間的制御およびモジュール性は、組み合わせて使用され、例えば、ある作用物質の存在下で細胞を一定時間インキュベートし、破壊による結合の逆転を誘導し、続いて、他のまたは異なった作用物質もしくは試薬の存在下でインキュベートすることによる。例えば、一態様では、T細胞を最初にある試薬で刺激して特定の強度または質のシグナルを送達し、一定時間後、そのようなシグナルを妨害し、質的または量的に異なる(例えば、より強い、より弱い、異なるシグナル伝達経路を活性化する、または異なる分化経路にとって重要であることが知られている)シグナルで置き換える。いくつかの態様では、そのような制御は、いくつかの利点を提供し、例えば、消耗またはエネルギーなどの望ましくない結果を回避しながら、ユーザーが所望の結果(例えば、増大または持続性)を最大にすることを可能にする。

【0010】

いくつかの態様では、時間的制御は、試薬または作用物質の可逆的結合を、例えば物質の添加により、破壊することによって達成される。例えば、いくつかの態様では、ある期間内に、例えばインキュベーション開始後5日以内に、および/またはインキュベーションの全長の一定のパーセンテージ以内に、例えば該期間の1/5、1/4、1/3もしくは1/2以内に、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合が破壊される。したがって、いくつかの場合には、該方法は培養T細胞の生成をもたらす。

【0011】

いくつかの態様では、インキュベーションは、受容体結合物質が該分子に特異的に結合し、それによって組成物中の1つ以上のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、実施される。

【0012】

いくつかの態様では、受容体結合物質と試薬との間の結合の破壊は、インキュベーション開始後30分を超えて行われる。例えば、いくつかの局面では、受容体結合物質と試薬との間の結合の破壊は、インキュベーション開始後1時間~4日、インキュベーション開始後6時間~3日、インキュベーション開始後12時間~2日、またはインキュベーション開始後1日~3日に行われる。いくつかの場合には、受容体結合物質と試薬との間の結合の破壊は、インキュベーション開始後約1時間~約4日、インキュベーション開始後約6時間~約3日、インキュベーション開始後約12時間~約2日、またはインキュベーション開始後約1日~約3日に行われる。いくつかの局面では、該破壊は、インキュベーション開始後約1時間またはそれを超えて、インキュベーション開始後1日、2日、3日または4日以内に、行われる

10

20

30

40

50

。いくつかの態様では、受容体結合物質の結合は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができるか、または開始する。いくつかの局面では、受容体結合物質はTCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合する。いくつかの場合には、受容体結合物質はCD3に特異的に結合する。

【0013】

いくつかの態様において、該分子(T細胞の表面上の分子)は、TCR/CD3複合体の成分であるか、またはCD3である。いくつかの局面では、該分子は第1の分子であり、受容体結合物質はさらに、T細胞の1つ以上の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる。いくつかの場合には、第2の分子は、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを誘導するか、または増強する、減衰させる、もしくは改変することができる。

10

【0014】

いくつかの局面では、受容体結合物質は結合パートナーC1を含む。いくつかの局面では、試薬に含まれる複数の結合部位は、2つ以上の結合部位Z1を含む。いくつかの場合には、2つ以上の結合部位Z1は、受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成するために、それぞれが結合パートナーC1に結合することができる。いくつかの態様では、受容体結合物質と試薬との間の結合の破壊は、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物を細胞に導入することを含む。

【0015】

いくつかの態様では、該受容体結合物質は第1の受容体結合物質であり、1つ以上のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実施される。いくつかの態様では、第2の受容体結合物質の第2の分子への結合は、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強する、減衰させる、もしくは改変する。

20

【0016】

いくつかの態様では、該試薬は、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む。そのような場合には、第2の受容体結合物質は、該試薬に可逆的に結合される。いくつかの局面では、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位と、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位とは、同じであっても異なってもよい。

【0017】

30

いくつかの局面では、第2の受容体結合物質は、2つ以上の結合部位Z1に可逆的に結合することができる、結合パートナーC1またはC2を含む。そのような場合には、第1および第2の受容体結合物質は、該2つ以上の結合部位Z1を介して試薬に可逆的に結合される。いくつかの場合には、第2の受容体結合物質は結合パートナーC2を含み、かつ試薬は複数の結合部位Z2をさらに含む。複数の結合部位Z2は、結合パートナーC2に結合して、第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。いくつかの局面では、C2とC1は、同じもしくは実質的に同じであるか、または同じもしくは実質的に同じ部分を含む。いくつかの場合には、Z1とZ2は、同じもしくは実質的に同じであるか、または同じもしくは実質的に同じ部分を含む。

【0018】

40

いくつかの場合には、該試薬は第1の試薬であり、第2の受容体結合物質に可逆的に結合する少なくとも第2の試薬の存在下で、インキュベーションが実施される。いくつかの態様では、該インキュベーションは、第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合する条件下で行われる。そのような局面では、第2の受容体結合物質の第2の分子への結合は、例えばT細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰もしくは改変するシグナルを誘導またはモジュレートする。

【0019】

いくつかの態様では、該破壊は、第1の受容体結合物質と試薬との間および/または第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物を細胞に導入する工程を含む。いくつかの態様では、該破壊は、第1の受容体結合物質により誘

50

導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させ、かつ第2の受容体結合物質により誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる。

【0020】

本明細書では、いくつかの態様において、T細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、T細胞を含有する組成物を、T細胞の表面上に発現された第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程を含む。いくつかの局面では、第1の受容体結合物質の第1の分子への結合は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする。いくつかのそのような態様では、該組成物はさらに、第2の受容体結合物質の存在下でインキュベートされるが、第2の受容体結合物質は、それに可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている。いくつかの局面では、第2の受容体結合物質は、T細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる。いくつかの場合には、第2の受容体結合物質の第2の分子への結合は、T細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートして、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変する。いくつかの局面では、インキュベーション開始後5日以内に、第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合が破壊され、それによって培養T細胞が生成される。

10

【0021】

いくつかの態様において、第2のシグナルは、T細胞において第1の分子を通じて送達されるシグナルを増強、減衰または改変する。

【0022】

20

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、インキュベーションは、第1の受容体結合物質が第1の分子に特異的に結合しかつ/または第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合し、それによってT細胞における1つまたは複数のシグナルを誘導またはモジュレートする条件の下で、行われる。いくつかの態様において、破壊は、インキュベーションの開始後30分を超えてから行われる。いくつかの態様において、破壊はインキュベーション開始後1時間～4日に、インキュベーション開始後6時間～3日に、インキュベーション開始後12時間～2日にもしくはインキュベーション開始後1日～3日に行われ；または破壊はインキュベーション開始後約1時間～約4日に、インキュベーション開始後約6時間～約3日に、インキュベーション開始後約12時間～約2日にもしくはインキュベーション開始後約1日～約3日に行われ；または破壊はインキュベーション開始後約1時間もしくはそれを超えてから、インキュベーション開始後1日、2日、3日もしくは4日以内に、行われる。

30

【0023】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、結合パートナーC1を含む。いくつかのそのような態様において、試薬によって含まれる複数の結合部位は、各々が結合パートナーC1に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つまたはそれ以上の結合部位Z1を含む。

【0024】

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、第2のシグナルは、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルであり；第2のシグナルは、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができ；または第2の分子は、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であり、またはTNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、第2の分子は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMの中から選択される。いくつかの態様において、第2の分子はCD28である。

40

【0025】

いくつかの態様において、第2の分子は、接着分子でありもしくは接着分子を含み、またはサイトカイン産生、ケモカイン産生および/もしくは接着分子の発現を誘導する因子である。

50

【0026】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、IL-2、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17およびTNFの中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-12R、IFN-ガンマR、IL-4RおよびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15およびIL-17の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

10

【0027】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

20

【0028】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；あるいは第2の受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、CXCR3、CCR7、CXCR1およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

30

【0029】

いくつかの態様において、接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、接着分子は、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1およびVLA-4の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。

40

【0030】

いくつかの態様において、因子は核因子である。いくつかの態様において、因子はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファである。

【0031】

いくつかの態様において、破壊は、第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物を細胞に導入することを含む。いくつかの態様において、破壊は、第2の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされるシグナルを終結または減少させる。例えば、いくつかの態様において、第2の分子はCD28であり、破壊はT細胞におけるCD28共刺激シグナルを終結または減少させる。

50

【0032】

いくつかの態様において、インキュベーションは、1つまたは複数のT細胞の表面上の第3の分子に特異的に結合することができる第3の受容体結合物質の存在下においてさらに行われる。

【0033】

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、第1の受容体結合物質は、T細胞におけるTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上に発現される第1の分子に特異的に結合し；第2の受容体結合物質は、第2の分子に特異的に結合し、それによってT細胞における第2のシグナルを誘導またはモジュレートし；かつ第3の受容体結合物質は、細胞における追加のシグナルを誘導またはモジュレートするT細胞の表面上の第3の分子に特異的に結合する。

10

【0034】

いくつかの態様において、第1の分子はCD3である。

【0035】

いくつかの態様において、第2のシグナルは、第1の分子を通じて送達されるシグナルを増強、減衰または改変する。いくつかの態様において、第2の分子は、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であり、またはTNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、第2の分子は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMの中から選択される。いくつかの態様において、第2の分子はCD28である。

20

【0036】

いくつかの態様において、第3の分子は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体であり、または接着分子でありもしくは接着分子を含み、またはサイトカイン産生、ケモカイン産生および/もしくは接着分子の発現を誘導する因子である。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第3の受容体結合物質は、IL-2、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17およびTNFの中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

30

【0037】

いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-12R、IFN-ガンマR、IL-4RおよびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第3の受容体結合物質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15およびIL-17の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第3の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第3の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

40

【0038】

いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、C

50

CR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；あるいは第3の受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、CXCR3、CCR7、CXCR1およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第3の受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

【0039】

10

いくつかの態様において、接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、接着分子は、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1およびVLA-4の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。

【0040】

いくつかの態様において、因子は核因子である。いくつかの態様において、因子はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファである。

【0041】

いくつかの態様において、第3の受容体結合物質は、第1の試薬もしくは第2の試薬に可逆的に結合し；またはインキュベーションは、第3の受容体結合物質に可逆的に結合するさらなる試薬の存在下において行われる。

20

【0042】

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、本方法は同様に、破壊の後に、T細胞を含む組成物をさらにインキュベートする段階を含む。いくつかの態様において、インキュベーションおよびさらなるインキュベーションは同じ容器内で行われ；ならびに/あるいはさらなるインキュベーションは、物質の存在下において行われ；ならびに/あるいは本方法は、さらなるインキュベーションの前に細胞組成物から物質、受容体結合物質、第2の受容体結合物質および/または試薬を除去する段階を含まない。

30

【0043】

いくつかの態様では、該インキュベーションおよび/もしくはさらなるインキュベーションを約37℃±2℃で実施し；かつ/または、該インキュベーションおよび/もしくはさらなるインキュベーションを、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実施する。いくつかの態様では、さらなる作用物質は、T細胞、CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞の増殖を増強または誘導することができる。いくつかの態様では、さらなる作用物質は、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択されるサイトカインである。いくつかの態様では、さらなるインキュベーションを、14日を超えない、12日を超えない、10日を超えない、8日を超えない、または6日を超えない期間にわたって実施する。

【0044】

40

本明細書では、T細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、T細胞を含有する組成物を、T細胞の表面上のCD28分子に特異的に結合する受容体結合物質の存在下において、該細胞内でCD28を介したシグナル伝達をもたらす条件下で、インキュベートする工程；ならびに、該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質とCD28分子との結合を排除または低減する工程であって、そのためにCD28シグナル伝達が該細胞において終結または減少し、それによって培養T細胞が生成される、工程を含む。いくつかの態様において、該排除または低減は、インキュベーション開始後4日以内、3日以内、2日以内または1日以内実施される。

【0045】

いくつかの場合には、該排除または低減は、インキュベーション開始後4日以内、3日以

50

内、2日以内または1日以内に達成される。場合によっては、排除または低減する工程は細胞を洗浄することを含み、それにより、CD28に特異的に結合していない受容体結合物質が該組成物から除去または低減される。いくつかの局面では、排除する工程は、受容体結合物質とCD28分子との間の結合相互作用を逆転させることを含み、さらに細胞を洗浄して、受容体結合物質を該組成物から除去または低減させることを含む。

【0046】

いくつかの局面では、該インキュベーションの少なくとも一部の間に、および/または該インキュベーションに続いて、組成物中のT細胞を、TCR/CD3複合体の分子に特異的に結合する作用物質の存在下でインキュベートし、それによって該細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする。

10

【0047】

本明細書では、いくつかの局面において、T細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、T細胞を含有する組成物を、受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程を含む。いくつかの態様では、受容体結合物質は、それに可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合される。場合によっては、該受容体結合物質は、標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートしかつ/または標的細胞の機能を改変する様式で、CD28、CD3、またはCD40以外の標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができ、それによって培養標的細胞が生成される。いくつかの態様では、分子はCD137ではなく、かつ/または受容体結合物質はCD137に特異的に結合しない。

【0048】

20

いくつかの局面では、受容体結合物質が該分子に特異的に結合し、それによってT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、該インキュベーションが実施される。いくつかの態様では、該シグナルはTCR/CD3複合体関連シグナルではない。

【0049】

いくつかの態様では、該シグナルはTCR/CD3複合体関連シグナルではない。

【0050】

いくつかの態様では、受容体結合物質は結合パートナーC1を含む。いくつかのそのような態様では、試薬の複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1を含み、それぞれの結合部位Z1が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。

30

【0051】

いくつかの態様では、該分子はCD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ/または、受容体結合物質はCD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、またはHVEMに特異的に結合する。

【0052】

いくつかの態様では、該受容体結合物質は第2の受容体結合物質であり、かつ該分子は第2の分子であり、1つ以上のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実施され、第1の分子は任意で、組成物中の1つ以上のT細胞において第1のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる。いくつかの態様では、第1の受容体結合物質は試薬に可逆的に結合され、該試薬は第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質のための複数の結合部位を含む；または、第1の受容体結合物質は、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に、可逆的に結合される。

40

【0053】

いくつかの態様では、第1の受容体結合物質は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる。いくつかの局面では、第1の受容体結合物質は、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合する。いくつかの場合には、第1の受容体結合物質はCD3に特異的に結合する。

【0054】

50

いくつかの態様では、第2の受容体結合物質の第2の分子への特異的結合は、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変することができる。場合によっては、第2の受容体結合物質の第2の分子への特異的結合は、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強または強化することができる。

【0055】

本明細書では、いくつかの態様において、T細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、第1の受容体結合物質の存在下で、T細胞を含有する組成物をインキュベートする工程を含み、第1の受容体結合物質は、それに可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合される。いくつかの場合には、第1の受容体結合物質は、組成物中のT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートするように、T細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる。いくつかの態様では、該方法は、T細胞を含有する組成物を、第2の受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程を含み、第2の受容体結合物質は、第2の受容体結合物質のための複数の結合部位をさらに含む該試薬に、または第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に、可逆的に結合され得る。いくつかの局面では、第2の受容体結合物質は、組成物中のT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートするように、T細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる。いくつかの局面では、第2の分子はCD28以外である。いくつかの態様では、インキュベーションは、該シグナルおよび/または第2のシグナルが組成物中のT細胞において誘導またはモジュレートされる条件下で行われ、それによって培養T細胞が生成される。

【0056】

いくつかの態様では、第1の受容体結合物質はTCR/CD3複体のメンバーに特異的に結合し、かつ/または第1の受容体結合物質はCD3に特異的に結合する。

【0057】

いくつかの場合には、第2の受容体結合物質の第2の分子への特異的結合は、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる。いくつかの局面では、第2の受容体結合物質の第2の分子への特異的結合は、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変することができる。いくつかの態様では、第2の受容体結合物質の第2の分子への特異的結合は、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強または強化することができる。

【0058】

いくつかの態様では、第2の分子であり得る該分子は、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMである。いくつかの局面では、第2の受容体結合物質であり得る該受容体結合物質は、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMに特異的に結合する。いくつかの態様では、第2の分子であり得る該分子は、CD137ではなく、かつ/または第2の受容体結合物質であり得る該受容体結合物質は、CD137に特異的に結合しない。

【0059】

いくつかの局面では、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質は、該試薬に可逆的に結合する。いくつかの態様では、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質はそれぞれ、個々に結合パートナーC1を含み、該複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1を含み、それぞれが結合パートナーC1に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。他の態様では、第1の受容体結合物質は結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質は結合パートナーC2を含み、該複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1を含み、それぞれが結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。さらなる態様では、第1の受容体結合物質は結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質は結合パートナーC2を含み、該複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1および2つ以上の結合部位Z2を含み、Z1のそれぞれが結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合

物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができ、Z2のそれぞれが結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。

【0060】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは受容体結合物質は、IL-2、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17およびTNFの中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-12R、IFN-ガンマR、IL-4RおよびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは受容体結合物質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15およびIL-17の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

10

【0061】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

20

【0062】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；あるいは受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、CXCR3、CCR7、CXCR1およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合し；あるいは受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

30

【0063】

いくつかの態様において、接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、接着分子は、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1およびVLA-4の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。

40

【0064】

いくつかの態様において、因子は核因子である。いくつかの態様において、因子はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファである。

【0065】

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、インキュベーションは、受容体結合物質が分子に特異的に結合し、それによって標的細胞におけるシグナルを誘導もしくはモジュレートする、および/または標的細胞における機能を改変する

50

条件の下で行われる。いくつかの態様において、受容体結合物質は、結合パートナーC1を含み、かつ複数の結合部位は、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つまたはそれ以上の結合部位Z1を含む。いくつかの態様において、受容体結合物質は追加の受容体結合物質であり、分子は追加の分子であり、かつインキュベーションは、1つまたは複数のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下においてさらに行われ、この第1の分子は、組成物中の1つまたは複数のT細胞において第1のシグナルを任意で誘導またはモジュレートすることができる。

【0066】

いくつかの態様において、第1の受容体結合物質は、第1の受容体結合物質のための複数の結合部位を含む試薬および追加の受容体結合物質に可逆的に結合し；または第1の受容体結合物質は、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合する。いくつかの態様において、第1の受容体結合物質は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；および/または第1の受容体結合物質は、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；および/または第1の受容体結合物質はCD3に特異的に結合する。

【0067】

いくつかの態様において、第1の受容体結合物質は、結合パートナーC2を含み、かつ複数の結合部位は、各々が結合パートナーC2に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つまたはそれ以上の結合部位Z2を含む。

【0068】

いくつかの態様において、インキュベーションは、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下においてさらに行われ、この第2の分子は任意で、組成物中の標的細胞におけるシグナルを誘導またはモジュレートして、第1の分子を通じて送達されるシグナルを増強、減衰または改変することができる。

【0069】

いくつかの態様において、第2のシグナルは、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルであり；第2のシグナルは、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができ；または第2の分子は、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であり、またはTNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、第2の分子は、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMの中から選択され；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMに特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の分子はCD28およびCD137の中から選択される。いくつかの態様において、第2の分子はCD28である。

【0070】

本明細書では、標的細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、標的細胞を含有する組成物を、受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程を含む。受容体結合物質は、それに可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである試薬に、可逆的に結合され得る。いくつかの場合には、受容体結合物質は、組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートするように、標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる。いくつかの局面では、ストレプトアビジンムテインは、正味の負電荷を含むか、またはSEQ ID NO: 4もしくは6に示される配列を有するストレプトアビジンムテインよりも低い等電点を呈し、それによって培養標的細胞が生成される。

【0071】

本明細書では、いくつかの局面において、標的細胞を培養するための方法が提供され、該方法は、標的細胞を含有する組成物を、受容体結合物質の存在下でインキュベートする

10

20

30

40

50

工程を含み、受容体結合物質は、それに可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはストレプトアビジンムテインである試薬に、可逆的に結合されている。いくつかの態様では、受容体結合物質は、組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートするように、標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる。いくつかの場合には、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 1～6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むストレプトアビジンまたはムテインよりも、アミノ酸配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)

を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対して高い親和性を示し、それによって培養標的細胞をもたらす。

10

【0072】

いくつかの態様では、受容体結合物質が該分子に特異的に結合し、それによって組成物中の1つ以上の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが実施される。

【0073】

いくつかの場合には、試薬の複数の結合部位は、2つ以上の結合部位Z1を含む。いくつかの場合には、受容体結合物質は結合パートナーC1を含み、C1は結合部位Z1に可逆的に結合することができ、C1とZ1との間の可逆的結合は、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合に影響を及ぼす。いくつかの態様では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは複数の結合部位Z1を含み、複数の受容体結合物質が該試薬に可逆的に結合される。

20

【0074】

いくつかの態様において、標的細胞は免疫細胞を含む。例えば、いくつかの態様では、標的細胞は血液細胞を含み；標的細胞は白血球を含み；標的細胞はリンパ球を含み；標的細胞はB細胞を含み；標的細胞はB細胞集団を含み；標的細胞はT細胞を含み；標的細胞はT細胞集団を含み；かつ/または標的細胞はナチュラルキラー(NK)細胞を含む。いくつかの態様では、標的細胞は、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、調節性T細胞もしくはその集団、NK細胞もしくはその集団、抗原特異的B細胞もしくはその集団、メモリーB細胞もしくはその集団、または調節性B細胞もしくはその集団を含む。いくつかの態様では、標的細胞はT細胞である。

30

【0075】

いくつかの態様において、該分子はT細胞の表面上に存在し、受容体結合物質は組成物中のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる。いくつかの局面では、受容体結合物質はT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ、かつ/または受容体結合物質はTCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合する。ある場合には、受容体結合物質はCD3に特異的に結合する。いくつかの場合には、該分子は第1の分子であり、受容体結合物質は、第1の分子に、場合によっては標的細胞の1つ以上の表面上の第2の分子に、特異的に結合することができる。いくつかの態様では、第2の分子への結合は、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変することができる。

40

【0076】

いくつかの態様において、分子は第1の分子であり、かつ受容体結合物質は、1つまたは複数の標的細胞の表面上の第1の分子および第2の分子に特異的に結合することができ、この第2の分子への結合が標的細胞におけるシグナルを誘導またはモジュレートする。いくつかの態様において、第2の分子への結合は任意で、第1の分子を通じて送達されるシグナルを増強、減衰または改変することができる。

【0077】

該受容体結合物質は第1の受容体結合物質であり、第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションをさらに実施する。第2の受容体結合物質は、1つ以上の標的細胞の表面

50

上の第2の分子に特異的に結合することができる。いくつかの場合には、第2の受容体結合物質の第2の分子への結合は、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変するように、シグナルを誘導またはモジュレートすることができる。

【0078】

いくつかの態様では、第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合する条件下で該インキュベーションを実施し、それによって、組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートして、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強、減衰または改変する。いくつかの態様では、ストレプトアビジンムテインまたは類似体は、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、そのため第2の受容体結合物質はストレプトアビジンムテインまたは類似体に可逆的に結合される。

10

【0079】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は結合パートナーC1またはC2を含み、C1またはC2は、ストレプトアビジン類似体またはムテインに存在する2つ以上の結合部位Z2に可逆的に結合することができる。

【0080】

いくつかの場合には、追加の分子は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMである。いくつかの態様では、第2の受容体結合物質は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMに特異的に結合する。いくつかの局面では、追加の分子はCD40およびCD137である。いくつかの場合には、第2の受容体結合物質はCD40またはCD137に特異的に結合する。

20

【0081】

いくつかの態様において、第2の分子は、接着分子でありもしくは接着分子を含み、またはサイトカイン産生、ケモカイン産生および/もしくは接着分子の発現を誘導する因子である。

【0082】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、IL-2、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17およびTNFの中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-12R、IFN-ガンマR、IL-4RおよびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15およびIL-17の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

30

【0083】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

40

【0084】

50

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；あるいは第2の受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

10

【0085】

いくつかの態様において、接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、接着分子は、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1およびVLA-4の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。

【0086】

いくつかの態様において、因子は核因子である。いくつかの態様において、因子はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファである。

20

【0087】

第2の受容体結合物質は、複数の異なる受容体結合物質を含み、その各々は、組成物中のT細胞の表面上の同一または異なる第2の分子に個々に結合して、細胞における1つまたは複数のシグナルを集散的に誘導またはモジュレートすることができる。

【0088】

いくつかの態様において、該方法は、第1および/または第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊する工程をさらに含む。いくつかの局面では、該破壊は、インキュベーション開始後14日以内、インキュベーション開始後12日以内、インキュベーション開始後10日以内、インキュベーション開始後8日以内、またはインキュベーション開始後6日以内に行われる。

【0089】

30

いくつかの態様において、インキュベーションの少なくとも一部は、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実施される。いくつかの場合には、さらなる作用物質は、T細胞、CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞の増殖を増強または誘導することができる。いくつかの態様では、さらなる作用物質は、IL-2、IL-15またはIL-7などのサイトカインである。場合によっては、さらなる作用物質はCD28に特異的に結合せず、かつ/またはCD28シグナル伝達を誘導しない。

【0090】

いくつかの態様において、T細胞または標的細胞は、対象由来の初代培養細胞である。ある場合には、T細胞または標的細胞は対象から直接分離される。いくつかの態様では、T細胞は、分画されていないT細胞であり、濃縮もしくは分離されたCD3+ T細胞であり、濃縮もしくは分離されたCD4+ T細胞であり、または濃縮もしくは分離されたCD8+ T細胞である。いくつかの態様では、インキュベートする工程の前に、T細胞はCD62L+ 細胞について濃縮されておらず、かつ/またはナイーブT細胞について濃縮されていない。いくつかの場合には、T細胞または標的細胞はヒト細胞である。

40

【0091】

いくつかの局面では、該試薬は20nm未満、10nm未満、5nm未満または1nm未満のサイズを有する。いくつかの場合には、該試薬は 1.2g/cm^3 未満または 1.0g/cm^3 未満の密度を有する。

【0092】

いくつかの態様において、試薬はインキュベーションの間に、固体支持体、固定相、ビ

50

ーズ、微粒子、磁性粒子、および/またはマトリックスではなく、それらに結合しておらずまたはそれらと結び付いておらず；ならびに/あるいは試薬は柔軟性であり、金属もしくは磁性コアを含まず、完全にもしくは主に有機多量体から構成され、球状ではなく、実質的に球状もしくは均一な形状ではなく、および/または硬直していない。

【0093】

いくつかの態様において、該試薬は、前記インキュベーションの間、支持体または固体支持体に結合されていない。いくつかの態様では、該試薬は、前記インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体に結合されており、それによって、複数のT細胞または標的細胞が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体上に可逆的に固定化される。いくつかの態様において、支持体は固定相であるかもしくはそれを含み；かつ/または支持体は固体支持体であるかもしくはそれを含む。

10

【0094】

いくつかの態様では、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質は、ただ1つの結合部位、例えばB2を含む。いくつかの局面では、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質は、該分子に一価の様式で特異的に結合する。いくつかの態様では、第2の受容体結合物質は、ただ1つの結合部位、例えばB4を含む。いくつかの場合には、第2の受容体結合物質は、該分子に一価の様式で特異的に結合する。いくつかの態様では、B2またはB4のような結合部位は、抗体結合部位を含む。

【0095】

いくつかの局面において、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第2の受容体結合物質は、それぞれ個々に、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含む分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、またはMHC分子もしくはその結合断片である。そのような局面において、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第2の受容体結合物質は、抗体フラグメント、Fabフラグメント、二価抗体フラグメント、例えばF(ab')₂フラグメントまたは二価単鎖Fv (scFv)フラグメントを含む。いくつかの場合には、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第2の受容体結合物質は、一価抗体フラグメント、例えばFabフラグメント、FvフラグメントまたはscFvフラグメントである。いくつかの場合には、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第2の受容体結合物質は、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、例えば、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドをベースにしたムテイン、グルボディ(glubody)、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン(adnectin)またはアビマー(avimer)である。

20

30

【0096】

いくつかの態様において、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質には、CD3に特異的に結合する作用物質が含まれる。CD3に特異的に結合する作用物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメント、または抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子であり得る。いくつかの態様では、第2の受容体結合物質には、CD28、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40および/またはHVEMに特異的に結合する作用物質が含まれる。CD28、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40および/またはHVEMに特異的に結合する作用物質は、以下のものであり得る：抗CD28抗体、抗CD28抗体の二価抗体フラグメント、抗CD28抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD28結合分子、抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体フラグメント、抗CD90抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD90結合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体フラグメント、抗CD95抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD95結合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体の二価抗体フラグメント、抗CD154抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD154結合分子、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体フラグメント、抗CD137抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD137結合分子

40

50

、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の一価抗体フラグメント、抗ICOS抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性ICOS結合分子、抗LAT抗体、抗LAT抗体の一価抗体フラグメント、抗LAT抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性LAT結合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体の一価抗体フラグメント、抗CD27抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD27結合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体の一価抗体フラグメント、抗OX40抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性OX40結合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の一価抗体フラグメント、抗HVEM抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性HVEM結合分子、4-1BBリガンド、またはこれらの任意の混合物。

【0097】

10

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、受容体結合物質は抗体断片を含み；受容体結合物質はFab断片を含み；受容体結合物質は、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv)断片の中から選択される二価抗体断片であり；受容体結合物質は、Fab断片、Fv断片およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片であり；ならびに/あるいは受容体結合物質は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ(glubody)、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチンおよびアビマーの中から選択される抗体様の結合特性を有するタンパク質性結合分子である。

【0098】

20

本明細書において提供される方法のいずれかのいくつかの態様において、該試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、またはビオチン、ビオチン類似体もしくはその生物学的に活性な断片に可逆的に結合するストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するアビジンまたはストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート化基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンまたはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合することができる作用物質；FLAGペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質(MBP)に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチン化担体タンパク質に結合することができる作用物質であるか、またはそれを含む。

30

【0099】

いくつかの態様において、該試薬は、ビオチンまたは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインまたはアビジン類似体もしくはムテイン；ビオチン類似体または生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインまたはアビジン類似体もしくはムテイン；および/またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインまたはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む。

【0100】

40

いくつかの態様において、該試薬は、オリゴマーまたはポリマーであり、ストレプトアビジン、アビジン、またはビオチンもしくは生物学的に活性な断片に可逆的に結合するストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンまたはアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート化基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンまたはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合することができる作用物質；FLAGペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質(MBP)に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチン化担体タンパク質に結合するこ

50

とができる作用物質の、オリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、該試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む。いくつかの局面では、該オリゴマーまたはポリマーの個々の分子は、多糖または2官能性リンカーによって架橋される。

【0101】

いくつかの態様において、複数の結合部位Zは、少なくとも2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、72個またはそれ以上の結合部位を含む。

【0102】

いくつかの局面において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、以下のものである： 10
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)³-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) または Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

。

【0103】

いくつかの態様において、該試薬は、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列におけるストレプトアビジン中の位置に関して44位から47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val144-Thr45-Ala46-Arg47またはIle44-Gly45-Ala46-Arg47を含む、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む。いくつかの態様では、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列におけるストレプトアビジン中の位置に関して44位から47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val144-Thr45-Ala46-Arg47を含む。 20

【0104】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 3~6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの局面では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 3~6のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、かつVal144-Thr45-Ala46-Arg47またはIle44-Gly45-Ala46-Arg47に対応するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、ビオチンまたはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインまたはその生物学的に活性な断片、あるいはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する。いくつかの態様では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、ビオチンまたはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインまたはその生物学的に活性な断片、あるいはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、上記配列のいずれかの機能的断片に結合する。 30

【0105】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列におけるストレプトアビジン中の位置に関して117、120および/または121に対応する位置に、1つ以上のアミノ酸置換をさらに含む。いくつかの態様では、1つ以上のアミノ酸置換は、Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121またはPhe121の中から選択される。いくつかの態様では、1つ以上のアミノ酸置換はGlu117、Gly120またはTyr121である。 40

【0106】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 27または28に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの局面では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、SEQ ID NO: 28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89% 50

、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、かつVal44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121に対応するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、ビオチンまたは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインまたはその生物学的に活性な断片、あるいはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する。いくつかの態様では、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、ビオチンまたは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインまたはその生物学的に活性な断片、あるいはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、上記配列のいずれかの機能的断片に可逆的に結合する。

【0107】

10

いくつかの態様において、結合パートナーC1および/または結合パートナーC2は、独立して、以下のようなストレプトアビジン結合ペプチドを含む：

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)³-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)または Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

。

20

【0108】

いくつかの態様において、該破壊は、第1の受容体結合物質であり得る受容体結合物質および/または第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含有する組成物を、細胞に導入する工程を含む。いくつかの態様では、該物質は、遊離した結合パートナーであり、かつ/または競合物質である。いくつかの態様において、組成物中の該物質は、T細胞または標的細胞に弊害をもたらさない。いくつかの局面では、該物質の添加は、該物質を含まない匹敵するかまたは同じ条件下での、T細胞または標的細胞のインキュベーションと比較して、生存するT細胞または標的細胞のパーセンテージを、それぞれ90%、80%、70%、60%、または50%未満に低下させない。いくつかの態様では、該破壊は、T細胞または標的細胞において、受容体結合物質または第2の受容体結合物質の一方もしくは両方によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる。

30

【0109】

いくつかの態様において、該試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、アビジン類似体もしくはムテイン、またはその生物学的に活性な断片であるか、またはそれらを含む。いくつかの態様では、該物質は、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む。

【0110】

いくつかの態様において、該物質は、以下のようなストレプトアビジン結合ペプチドである：

40

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)³-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)または Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

。いくつかの態様では、該物質はC1もしくはその類似体であるか、またはC2もしくはその類似体である。

50

【0111】

いくつかの態様では、結合部位Z1と結合パートナーC1との間の可逆的結合、および/または結合部位Z2と結合パートナーC2との間の可逆的結合の解離定数(K_D)は、 10^{-2}M ~ 10^{-13}M の範囲である。

【0112】

いくつかの態様では、インキュベーションに先立って、細胞を、該組成物のT細胞または標的細胞に含まれるマーカーに特異的に結合する選択物質と接触させ、それによって、T細胞または標的細胞を含む組成物を生成させるか、または取得する。いくつかの態様では、該組成物のT細胞または標的細胞に含まれるマーカーに特異的に結合する選択物質の存在下で、インキュベーションの少なくとも一部を実施して、培養T細胞を、該マーカーを含むT細胞または標的細胞について濃縮する。

10

【0113】

いくつかの態様では、選択物質は試薬に可逆的に結合し、該試薬は、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位をさらに含む。いくつかの局面では、選択物質は、それに特異的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合される。

【0114】

いくつかの態様において、シグナルの誘導またはモジュレーションは、シグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、培養T細胞の増大(増殖)および/または活性化の増加をもたらす。ある態様では、その増加は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上である。いくつかの態様において、追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションは、追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、T細胞の増大(増殖)および/または活性化を増加させる。ある態様では、その増加は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上である。

20

【0115】

いくつかの態様において、該方法は、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、インキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ/またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のT細胞と各々比較して、該組成物中のT細胞の増大および/または増殖を増加させ、該組成物中のT細胞の代謝プロフィールを変更し、該組成物中のCD8⁺ T細胞のサブセットを変更し、かつ/または該組成物中の長寿命のメモリーT細胞のパーセンテージを増加させる。

30

【0116】

いくつかの態様において、該方法は、CD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞の数またはパーセンテージが、インキュベーション前の組成物中の、インキュベーション後であるが破壊の非存在下での組成物中の、あるいは類似のインキュベーション後であるが、CD28に特異的に結合しかつ/またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下で行った組成物中のCD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞の数またはパーセンテージとそれぞれ比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍増加した、培養T細胞をもたらす。いくつかの態様において、該方法は、組成物中のCD8⁺ T細胞の比率またはCD8⁺ T細胞の相対比率もしくは正規化比率が、インキュベーション前の組成物中の、インキュベーション後であるが破壊の非存在下での組成物中の、あるいは、類似のインキュベーション後であるが、CD28に特異的に結合しかつ/またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下での組成物中のCD8⁺ T細胞の比率または相対もしくは正規化比率と比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍増加した、培養T細胞をもたらす。いくつかの態様において、該方法は、組成物中のCD62L⁺細胞、任意で長寿命のメモリーT細胞またはメモリー幹細胞(T_{SCM})、の数またはパーセンテージが、インキュベーション前の組成物中の、イン

40

50

キューベーション後であるが破壊の非存在下での組成物中の、あるいは、類似のインキューベーション後であるがCD28に特異的に結合しかつ/またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下での組成物中のCD62L⁺、長寿命のメモリーT細胞またはT_{SCM}の対応する細胞集団の数またはパーセンテージと比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍増加した、培養T細胞をもたらす。

【0117】

いくつかの態様において、培養T細胞は、組成物中の総T細胞または組成物中の総細胞のパーセンテージとして、CD62Lについて表面陽性(CD62L⁺)である表現型を含むT細胞サブセットを35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%または90%以上含有する。

【0118】

いくつかの態様において、該T細胞サブセットは、CD127⁺；ならびに/またはCD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺、CD27⁺のいずれか1つ以上およびt-bet^{low}、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺、LFA-1⁺のいずれか1つ以上、を含む表現型をさらに含む。

【0119】

いくつかの態様において、該T細胞サブセットは、TCR再構成切除サークル(TCR rearrangement excisions circle:TREC)を低レベルで含む；および/またはKi-67であり得る増殖マーカーを発現する；および/または刺激物質の存在下で増殖する能力を示す；および/または刺激物質の存在下でIFN-γ、TNFもしくはIL-2などのサイトカインを産生する能力を示す。

【0120】

いくつかの態様において、刺激物質は、抗原、恒常性サイトカイン、例えばIL-15および/もしくはIL-17であるか、またはT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる作用物質である。

【0121】

いくつかの態様において、該T細胞サブセットは、長寿命のメモリーT細胞であるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、該T細胞サブセットはTメモリー幹細胞(T_{SCM})であるか、またはそれを含む。

【0122】

いくつかの態様において、該方法は、該集団のT細胞または標的細胞に組換え核酸分子を導入する工程をさらに含む。いくつかのそのような局面では、該核酸分子は組換えタンパク質をコードし、それによって、該細胞は組換えタンパク質を発現し得る。いくつかの態様では、組換え受容体は、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体(TCR)である。いくつかの局面では、該方法はインビトロまたはエキスピボで実施される。

【0123】

いくつかの態様において、該方法は、培養した細胞を、病気または疾患を有する対象に投与することをさらに含む。

【0124】

本明細書では、いくつかの局面において、本明細書に記載の方法によって生成された複数の培養T細胞または標的細胞、および任意で薬学的に許容される賦形剤、を含有する組成物が提供される。

【0125】

いくつかの態様では、該物質の添加後、該細胞は、30℃を超える温度で24時間を超えて、48時間を超えて、72時間を超えて、または96時間を超えて、インビトロまたはエキスピボでインキュベートされていない。

【0126】

本明細書では、いくつかの局面において、(a)受容体結合物質に結合することができる複数の結合部位を含む試薬と；(b) (i)該試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)T細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質とを含有する、製造物品も提供される。いくつかの態様では、例えば、該分子はCD28、CD3、またはCD40ではない。

10

20

30

40

50

【0127】

いくつかの態様において、該分子への結合は、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルをT細胞において誘導またはモジュレートする；および/または該分子への結合は、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強または強化する。いくつかの態様において、該分子は、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMの中から選択される。いくつかの態様では、該分子はCD137ではない。

【0128】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、サイトカイン受容体に特異的に結合し、ケモカイン受容体に特異的に結合し、接着分子でありもしくは接着分子を含み、またはサイトカイン産生、ケモカイン産生および/もしくは接着分子の発現を誘導する因子である。

10

【0129】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは受容体結合物質は、IL-2、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17およびTNFの中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、IL-12R、IFN-ガンマR、IL-4RおよびIL-17Rの中から選択されるサイトカインに特異的に結合し；あるいは受容体結合物質は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15およびIL-17の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

20

【0130】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；ならびに/あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質は、IL-7R、IL-21RおよびCD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合し；あるいは第2の受容体結合物質は、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9およびIL-15の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

30

【0131】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；あるいは受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、CXCR3、CCR7、CXCR1およびCXCR4の中から選択されるサイトカインに特異的に結合し；あるいは受容体結合物質は、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25の中から選択されるリガンドであり、またはその生物学的に活性な断片である。

40

【0132】

いくつかの態様において、接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、接着分

50

子は、LFA-1、L-セ렉チン、VCAM-1およびVLA-4の中から選択され、またはその生物学的に活性な断片である。

【0133】

いくつかの態様において、因子は核因子である。いくつかの態様において、因子はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファである。

【0134】

作用物質に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬に可逆的に結合する、1つまたは複数の受容体結合物質の存在下において標的細胞を含む組成物をインキュベートする段階を含む、標的細胞を培養するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの局面において、ストレプトアビジン類似体またはムテインは、正味の負電荷を含み、またはSEQ ID NO:4もしくは6に記載されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンムテインより小さい等電点を示し、および/またはSEQ ID NO: 1~6のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンもしくはムテインより高い、アミノ酸の配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)

を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対する親和性を示す。いくつかの態様において、作用物質は、試薬に可逆的に結合し、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる。

【0135】

いくつかの態様において、受容体結合物質は、結合パートナーC1を含む。いくつかの局面において、複数の結合部位は、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質または作用物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つまたはそれ以上の結合部位Z1を含む。

【0136】

いくつかの態様において、作用物質は選択物質または受容体結合物質である。

【0137】

いくつかの態様において、作用物質は、分子に特異的に結合する受容体結合物質であり、この分子は、TCR/CD3複合体、CD3、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子のメンバーでありまたはそれらを含み、あるいはTNFファミリーまたはTNF受容体ファミリーのメンバーであり、あるいは接着分子でありまたはそれを含み、あるいはサイトカイン産生、ケモカイン産生および/または接着分子の発現を誘導する因子である。

【0138】

いくつかの態様において、該受容体結合物質は第2の受容体結合物質であり、該分子は第2の分子であり、該試薬は、(c)第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位と、(d)(i)該試薬に可逆的に結合され、かつ(ii)T細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質とをさらに含む。

【0139】

いくつかの態様において、該作用物質または第1の受容体結合物質は、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し、かつ/または第1の受容体結合物質は、CD3に特異的に結合する。

【0140】

いくつかの態様において、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質は、それぞれ個々に、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1を含み、それぞれが結合パートナーC1に結合することができ、第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成する。いくつかの局面では、第1の受容体結合物質は結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質は結合パートナーC2を含み、複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1を含み、それぞれが結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合することができ、第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成する。いくつかの態様では、第1の受容体結合物質は結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物

質は結合パートナーC2を含み、複数の結合部位は2つ以上の結合部位Z1および2つ以上の結合部位Z2を含み、Z1のそれぞれが結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができ、Z2のそれぞれが結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる。

【0141】

いくつかの態様において、試薬は20nm未満、10nm未満、5nm未満または1nm未満のサイズを有する。いくつかの態様では、試薬は $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 未満または $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 未満の密度を有する。いくつかの態様では、試薬は支持体または固体支持体に結合されない。場合によっては、試薬は支持体に結合または固定化される。いくつかの場合には、支持体は固体支持体または固定相である。いくつかの局面では、支持体は、ビーズ、粒子、ナノ粒子またはミクロスフェアを含む。

10

【0142】

いくつかの態様において、作用物質は個々に、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含む分子、およびその結合断片の中から選択される。

【0143】

いくつかの態様において、作用物質、第2の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第1の受容体結合物質は、抗体フラグメントを含む。いくつかの局面では、作用物質、第2の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第1の受容体結合物質は、Fabフラグメントを含む。場合によっては、作用物質、第2の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第1の受容体結合物質は、二価抗体フラグメント、例えば F(ab')_2 フラグメントまたは二価単鎖Fv (scFv)フラグメントである。いくつかの態様では、作用物質、第2の受容体結合物質であり得る受容体結合物質、および/または第1の受容体結合物質は、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvフラグメントから選択される一価抗体フラグメントである。

20

【0144】

いくつかの態様において、作用物質または第1の受容体結合物質は、CD3に特異的に結合する作用物質を含む。いくつかの態様では、CD3に特異的に結合する作用物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメント、または抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子である。いくつかの態様では、作用物質または第2の受容体結合物質であり得る受容体結合物質は、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMに特異的に結合する作用物質を含み、例えば、以下のものを含む：抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体フラグメント、抗CD90抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD90結合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体フラグメント、抗CD95抗体の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD95結合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体の二価抗体フラグメント、抗CD154抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD154結合分子、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体フラグメント、抗CD137抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD137結合分子、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の二価抗体フラグメント、抗ICOS抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性ICOS結合分子、抗LAT抗体、抗LAT抗体の二価抗体フラグメント、抗LAT抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性LAT結合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体の二価抗体フラグメント、抗CD27抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD27結合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体の二価抗体フラグメント、抗OX40抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性OX40結合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の二価抗体フラグメント、抗HVEM抗体の一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性HVEM結合分子、またはこれらの任意の混合物。

30

40

【0145】

いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、およびアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそ

50

れを含む。いくつかの態様では、試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、および/またはアビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む。

【0146】

本明細書では、いくつかの局面において、本明細書に開示される試薬および任意で使用説明書を含むキットが提供される。いくつかの態様では、該キットは、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む。いくつかの態様では、該キットは、受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬を含む。いくつかの局面では、受容体結合物質は該試薬に可逆的に結合され、かつ標的細胞の表面上に発現された分子に特異的に結合することができる。いくつかの場合には、該分子への結合は、標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする。いくつかの場合には、該キットは、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む。

10

【0147】

いくつかの態様において、標的細胞はT細胞である。いくつかの態様では、試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、および/またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む。いくつかの態様では、試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、および/またはアビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む。

20

【0148】

いくつかの態様において、該物質には、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片が含まれる。

【0149】

いくつかの態様において、試薬は20nm未満、10nm未満、5nm未満または1nm未満のサイズを有する。いくつかの態様では、試薬は1.2g/cm³未満または1.0g/cm³未満の密度を有する。いくつかの態様では、試薬は支持体または固体支持体に結合されない。

【0150】

本明細書では、いくつかの局面において、標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物が提供される。いくつかの場合には、該組成物中の総T細胞または組成物中の総細胞のパーセンテージとして、該細胞の35%、40%、50%、60%、70%、80%または90%以上には、CD3+、CD4+またはCD8+およびCD62L+であり、かつCD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+およびCD27+の1つ以上、ならびにt-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+およびLFA-1+の1つ以上である表面表現型を含むT細胞サブセットが含まれる。いくつかの態様では、遺伝子操作の前または間に、T細胞サブセットを含む該複数のT細胞は、GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされなかった；組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7またはIL-15、の存在下でインキュベートされなかった；またはCD62L+細胞について濃縮されなかった。いくつかの態様では、該組成物は、GSK-P阻害剤または組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7またはIL-15、を含まない。

30

40

【0151】

いくつかの態様において、該T細胞サブセットは、少なくとも5×10⁶個、少なくとも1×10⁶個、または少なくとも2×10⁶個の細胞を含む。

【0152】

本明細書では、いくつかの態様において、標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物が提供される。いくつかの局面では、遺伝子操作されたT細胞は、T細胞サブセットを含むT細胞の集団に形質導入することから誘導され、該T細胞サブセットは、CD3+、CD4+またはCD8+およびCD62L+であり、かつCD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+およびCD27+の1つ以上、ならびにt-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+およびLFA-1+の1つ以上である表面表現型を含む。いくつか

50

の態様では、該T細胞サブセットは、該表現型を含む1つ以上のマーカーの表面発現に基づいてヒト対象から分離または濃縮された初代T細胞を含む集団と比較して、該集団中の総T細胞のより高いパーセンテージで、または該集団中の総T細胞のより多くの数で存在する。いくつかの態様では、該T細胞サブセットは、GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートしたT細胞の集団と比較して、該集団中の総T細胞のより高いパーセンテージで、または該集団中の総T細胞のより多くの数で存在する。いくつかの態様では、該T細胞サブセットは、組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7またはIL-15、の存在下でインキュベートしたT細胞の集団と比較して、該集団中の総T細胞のより高いパーセンテージで、または該集団中の総T細胞のより多くの数で存在する。いくつかの態様では、該T細胞サブセットは、抗CD3および抗CD8で刺激したが、該刺激または活性化を1日、2日、3日、4日もしくは5日以上

10

【0153】

いくつかの態様において、該T細胞サブセットは、該集団中の総T細胞のパーセンテージとして、約35%、40%、50%、60%、70%、80%または90%以上で該集団中に存在する。いくつかの態様では、該T細胞サブセットは、少なくとも 5×10^6 個、 1×10^6 個、 2×10^6 個またはそれ以上の細胞を含む。

【0154】

いくつかの態様において、該組成物は薬学的組成物である。

20

【0155】

本明細書では、いくつかの局面において、本明細書に記載の組成物、例えば薬学的組成物を、疾患または病気を有する対象に投与することを含む治療方法が、提供される。

【0156】

いくつかの態様において、該細胞は、組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)またはTCRを含む。いくつかの局面では、CARまたはトランスジェニックTCRなどの組換え受容体は、疾患または病気に関連する抗原に特異的に結合する。

【0157】

いくつかの態様において、該疾患または病気は、がん、自己免疫疾患もしくは障害、または感染性疾患である。

30

[本発明1001]

以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) T細胞を含む組成物を、受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程であって、該受容体結合物質が、(i)該受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)該組成物中のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の分子に特異的に結合する工程；および

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

[本発明1002]

40

受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって組成物中の1つまたは複数のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後30分を超えてから実行される、本発明1001または本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後1時間～4日、前記インキュベーションの開始後6時間～3日、前記インキュベーションの開始後12時間～2日、もしくは前記インキュベーションの開始後1日～3日に実行される；または

50

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間～約4日、前記インキュベーションの開始後約6時間～約3日、前記インキュベーションの開始後約12時間～約2日、もしくは前記インキュベーションの開始後約1日～約3日に実行される；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間もしくはそれを超えてから、前記インキュベーションの開始後1日、2日、3日、もしくは4日以内に、実行される、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

分子に対する受容体結合物質の結合が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始し；かつ／または

受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または

受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、

本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

分子が、TCR/CD3複合体の構成成分であるか、またはCD3である、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

分子が第1の分子であり、受容体結合物質がさらに、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができ、該第2の分子が、任意で、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを誘導するかもしくは増強するか、減衰させるか、または改変することができる、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、

本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記破壊が、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

受容体結合物質が第1の受容体結合物質であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行される、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の結合が、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1010の方法。

[本発明1012]

試薬が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、それによって、第2の受容体結合物質が該試薬に可逆的に結合されている、本発明1010または本発明1011の方法。

[本発明1013]

第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位、および第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位が、同じであるかまたは異なることができる、本発明1012の方法。

[本発明1014]

第2の受容体結合物質が、2つ以上の結合部位Z1に可逆的に結合することができる結合パートナーC1またはC2を含み、それによって、第1および第2の受容体結合物質が、2つ以上の結合部位Z1を介して試薬に可逆的に結合されており；かつ／または

第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、該試薬が、結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる複数の結合部位Z2をさらに含む、

10

20

30

40

50

本発明1012または本発明1013の方法。

[本発明1015]

C1およびC2が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含む；かつ／または

Z1およびZ2が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含む、

本発明1014の方法。

[本発明1016]

試薬が第1の試薬であり、少なくとも、第2の受容体結合物質に可逆的に結合されている第2の試薬の存在下で、インキュベーションが実行される、本発明1010または本発明1011の方法。

10

[本発明1017]

第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによってT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1010～1015のいずれかの方法。

[本発明1018]

第2のシグナルが、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1010～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記破壊が、第1の受容体結合物質と試薬との間、および／または第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、本発明1010～1018のいずれかの方法。

20

[本発明1020]

前記破壊が、第1の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させ、かつ、第2の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる、本発明1010～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) T細胞を含む組成物を、

(i) T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式で、T細胞の表面上に発現している第1の分子に特異的に結合する、第1の受容体結合物質；および

30

(ii) (i) 第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) T細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合する、第2の受容体結合物質

の存在下でインキュベートする工程；ならびに

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

[本発明1022]

40

第2のシグナルが、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1021の方法。

[本発明1023]

第1の受容体結合物質が第1の分子に特異的に結合しかつ／または第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによってT細胞において1つまたは複数のシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1021または本発明1022の方法。

[本発明1024]

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後30分を超えてから実行される、本発明1021～1023のいずれかの方法。

50

[本発明1025]

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後1時間～4日、前記インキュベーションの開始後6時間～3日、前記インキュベーションの開始後12時間～2日、もしくは前記インキュベーションの開始後1日～3日に実行される；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間～約4日、前記インキュベーションの開始後約6時間～約3日、前記インキュベーションの開始後約12時間～約2日、もしくは前記インキュベーションの開始後約1日～約3日に実行される；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間もしくはそれを超えてから、前記インキュベーションの開始後1日、2日、3日、もしくは4日以内に、実行される、
本発明1021～1024のいずれかの方法。

10

[本発明1026]

第2の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、
本発明1021～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる；
または

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリ分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、
本発明1007～1026のいずれかの方法。

20

[本発明1028]

第2の分子が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、本発明1007～1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

第2の分子がCD28である、本発明1007～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

第2の分子が、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、本発明1007～1029のいずれかの方法。

30

[本発明1031]

第2の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1027または本発明1030の方法。

[本発明1032]

第2の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第2の受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、およびTNFの中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1027、1030、および1031のいずれかの方法。

40

[本発明1033]

第2の受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

50

本発明1027および1030～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1027または本発明1030の方法。

[本発明1035]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1027、1030、および1034のいずれかの方法。

10

[本発明1036]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1027、1030、1034、および1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

第2の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、本発明1027または本発明1030の方法。

20

[本発明1038]

第2の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

第2の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1027、1030、および1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

第2の受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1027、1030、1037、および1038のいずれかの方法。

30

[本発明1040]

接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a（LFA-1）、CD29、CD54（ICAM-1）、CD62L（L-セ렉チン）、およびCD29/CD49d（VLA-4）、CD106（VCAM-1）の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1027または本発明1030の方法。

[本発明1041]

接着分子が、LFA-1、L-セ렉チン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1027、1030、および1040のいずれかの方法。

40

[本発明1042]

因子が核因子である、本発明1027または本発明1030の方法。

[本発明1043]

因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ （ROR γ ）またはROR α である、本発明1027、1030、および1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記破壊が、第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、本発明1007～1043のいずれかの方法。

50

[本発明1045]

前記破壊が、第2の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる、本発明1044の方法。

[本発明1046]

第2の分子がCD28であり、破壊が、T細胞においてCD28共刺激シグナルを終結または減少させる、本発明1044または本発明1045の方法。

[本発明1047]

1つまたは複数のT細胞の表面上の第3の分子に特異的に結合することができる第3の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行される、本発明1007～1046のいずれかの方法。

10

[本発明1048]

第1の受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式で、T細胞の表面上に発現している第1の分子に特異的に結合し；

第2の受容体結合物質が、第2の分子に特異的に結合し、それによってT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートし；かつ

第3の受容体結合物質が、該細胞において追加のシグナルを誘導またはモジュレートする、T細胞の表面上の第3の分子に特異的に結合する、
本発明1047の方法。

[本発明1049]

第1の分子がCD3である、本発明1047または本発明1048の方法。

20

[本発明1050]

第2のシグナルが、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1047～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、本発明1047～1050のいずれかの方法。

[本発明1052]

第2の分子が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、本発明1047～1051のいずれかの方法。

30

[本発明1053]

第2の分子がCD28である、本発明1047～1052のいずれかの方法。

[本発明1054]

第3の分子が、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体である、または、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、本発明1047～1053のいずれかの方法。

[本発明1055]

第3の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1054の方法。

40

[本発明1056]

第3の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第3の受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、およびTNFの中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054または本発明1055の方法。

[本発明1057]

50

第3の受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第3の受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

第3の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1054の方法。

[本発明1059]

第3の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第3の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054または本発明1058の方法。

[本発明1060]

第3の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第3の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054、1058、および1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

第3の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、本発明1054の方法。

[本発明1062]

第3の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

第3の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054または本発明1061の方法。

[本発明1063]

第3の受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する；または

第3の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1054、1061、および1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a（LFA-1）、CD29、CD54（ICAM-1）、CD62L（L-セレクチン）、およびCD29/CD49d（VLA-4）、CD106（VCAM-1）の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1054の方法。

[本発明1065]

接着分子が、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1054または本発明1064の方法。

[本発明1066]

因子が核因子である、本発明1054の方法。

[本発明1067]

因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ （ROR γ ）またはROR α である、本発明1054または本発明1066の方法。

[本発明1068]

10

20

30

40

50

第3の受容体結合物質が、第1の試薬もしくは第2の試薬に可逆的に結合されている；または

第3の受容体結合物質に可逆的に結合されているさらなる試薬の存在下で、インキュベーションが実行される、

本発明1047～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

前記破壊の後、T細胞を含む組成物をさらにインキュベートする工程を含む、本発明1001～1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

インキュベーションおよびさらなるインキュベーションが、同じ容器において実行される；かつ／または

さらなるインキュベーションが、前記物質の存在下で実行される；かつ／または前記方法が、前記物質、受容体結合物質、第2の受容体結合物質、および／もしくは試薬を、さらなるインキュベーションの前に細胞組成物から除去する工程を含まない、本発明1069の方法。

[本発明1071]

インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ でもしくは約 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で実行される；かつ／または

インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、本発明1001～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

さらなる作用物質が、T細胞、CD4⁺ T細胞、および／またはCD8⁺ T細胞の増殖を増強または誘導することができる、本発明1071の方法。

[本発明1073]

さらなる作用物質が、IL-2、IL-15、およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、本発明1072の方法。

[本発明1074]

さらなるインキュベーションが、14日を超えない、12日を超えない、10日を超えない、8日を超えない、または6日を超えない期間にわたって実行される、本発明1069～1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

T細胞を含む組成物を、細胞においてCD28を介したシグナル伝達をもたらす条件下で、T細胞の表面上のCD28分子に特異的に結合する受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程；および

該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質とCD28分子との結合を排除するかまたは低減させ、これにより、CD28シグナル伝達が細胞において終結または減少し、それによって培養T細胞が生成される工程。

[本発明1076]

排除または低減が、インキュベーションの開始後4日以内、3日以内、2日以内、または1日以内に実行される、本発明1075の方法。

[本発明1077]

排除または低減が、

それによって、CD28に特異的に結合されていない任意の受容体結合物質が組成物から除去されるかもしくは低減する、細胞の洗浄；または

受容体結合物質を組成物から除去するためもしくは低減させるための細胞の洗浄を任意でさらに含む、受容体結合物質とCD28分子との間の結合相互作用の逆転を含む、本発明1075または本発明1076の方法。

[本発明1078]

10

20

30

40

50

インキュベーションの少なくとも一部の間、および／またはインキュベーションの後に、組成物中のT細胞を、TCR/CD3複合体の分子に特異的に結合する作用物質の存在下でインキュベートし、それによって、TCR/CD3複合体関連シグナルが細胞において誘導またはモジュレートされる、本発明1075～1077のいずれかの方法。

[本発明1079]

標的細胞を含む組成物を、受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程であって、該受容体結合物質が、(i)該受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii)標的細胞においてシグナルを誘導もしくはモジュレートしかつ／または標的細胞の機能を変更する様式でCD28、CD3、またはCD40以外の標的細胞の表面上の分子に特異的に結合し、それによって培養標的細胞が生成される工程を含む、標的細胞を培養するための方法。

10

[本発明1080]

分子がCD137ではなく、かつ／または、受容体結合物質がCD137に特異的に結合しない、本発明1079の方法。

[本発明1081]

受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1079または本発明1080の方法。

[本発明1082]

シグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルではない、本発明1079～1081のいずれかの方法。

20

[本発明1083]

受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、本発明1079～1082のいずれかの方法。

[本発明1084]

分子が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または

受容体結合物質が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、本発明1079～1083のいずれかの方法。

30

[本発明1085]

受容体結合物質が第2の受容体結合物質であり、分子が第2の分子であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第1の分子が、任意で、組成物中の1つまたは複数のT細胞において第1のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、本発明1079～1084のいずれかの方法。

[本発明1086]

第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質に対する複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている；または

40

第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合されている、本発明1085の方法。

[本発明1087]

第1の受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または

第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、

本発明1085または本発明1086の方法。

[本発明1088]

50

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、もしくは改変することができる；または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる、
本発明1085～1087のいずれかの方法。

[本発明1089]

T細胞を含む組成物を、

(i)(i)第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)該組成物中のT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合する、第1の受容体結合物質；および

(ii)(i) (a) 第2の受容体結合物質に対する複数の結合部位をさらに含む試薬、または (b) 第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬のいずれかに可逆的に結合されており、かつ(ii)該組成物中のT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合し、該第2の分子がCD28以外である、第2の受容体結合物質
の存在下でインキュベートする工程であって、組成物中のT細胞においてシグナルおよび／または第2のシグナルが誘導またはモジュレートされる条件下で、該インキュベーションが行われ、それによって培養T細胞が生成される工程を含む、T細胞を培養するための方法。

[本発明1090]

第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し、かつ／または、第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、本発明1089の方法。

[本発明1091]

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルを誘導もしくはモジュレートすることができ；かつ／または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、もしくは改変することができる；または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる、
本発明1089または本発明1090の方法。

[本発明1092]

第2の分子が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または

第2の受容体結合物質が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、
本発明1085～1091のいずれかの方法。

[本発明1093]

第2の分子がCD137ではなく、かつ／または、第2の受容体結合物質がCD137に特異的に結合しない、本発明1085～1092のいずれかの方法。

[本発明1094]

第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が、試薬に可逆的に結合し；かつ

(i)第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が各々個々に、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含むか；または

(ii)第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含むか；または

(iii)第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1、および、各々が結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む
のいずれかである、

本発明1085～1093のいずれかの方法。

[本発明1095]

受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1079～1083のいずれかの方法。

10

[本発明1096]

受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、およびTNFの中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1079～1083および1095のいずれかの方法。

[本発明1097]

20

受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1079～1083、1095、および1096のいずれかの方法。

[本発明1098]

受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1079～1083のいずれかの方法。

[本発明1099]

受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

30

受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1079～1083および1098のいずれかの方法。

[本発明1100]

受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1079～1083、1098、および1099のいずれかの方法。

40

[本発明1101]

受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、本発明1079～1083のいずれかの方法。

[本発明1102]

受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

50

本発明1079～1083および1101のいずれかの方法。

[本発明1103]

受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1079～1083、1101、および1102のいずれかの方法。

[本発明1104]

接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1079～1083のいずれかの方法。

[本発明1105]

接着分子が、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1079～1083および1104のいずれかの方法

。

[本発明1106]

因子が核因子である、本発明1079～1083のいずれかの方法。

[本発明1107]

因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ (ROR γ) またはROR α である、本発明1079～1083および1106のいずれかの方法。

[本発明1108]

受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって標的細胞においてシグナルを誘導もしくはモジュレートしかつ／または標的細胞における機能を変更する条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1079～1083および1095～1107のいずれかの方法。

[本発明1109]

受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、本発明1079～1083および1095～1108のいずれかの方法。

[本発明1110]

受容体結合物質が追加の受容体結合物質であり、分子が追加の分子であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第1の分子が、任意で、組成物中の1つまたは複数のT細胞において第1のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、本発明1079～1083および1095～1109のいずれかの方法。

[本発明1111]

第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質および追加の受容体結合物質に対する複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている；または

第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合されている、

本発明1110の方法。

[本発明1112]

第1の受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または

第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、

本発明1110または本発明1111の方法。

[本発明1113]

第1の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC2に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む、本発明1110～1112のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1114]

1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第2の分子が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するように組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、本発明1110～1113のいずれかの方法。

[本発明1115]

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる；
または

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリ分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、

本発明1114の方法。

[本発明1116]

第2の分子が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または

第2の受容体結合物質が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、

本発明1114または本発明1115の方法。

[本発明1117]

第2の分子が、CD28およびCD137の中から選択される、本発明1114～1116のいずれかの方法。

[本発明1118]

第2の分子がCD28である、本発明1114～1117のいずれかの方法。

[本発明1119]

標的細胞を含む組成物を、1つまたは複数の受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程であって、該受容体結合物質が、(i)該受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii)該組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式で標的細胞の表面上の分子に特異的に結合し、該ストレプトアビジンムテインが、正味の負電荷を含むか、またはSEQ ID NO: 4もしくは6に示されるストレプトアビジンムテインよりも低い等電点を呈し、それによって培養標的細胞が生成される工程

を含む、標的細胞を培養するための方法。

[本発明1120]

標的細胞を含む組成物を、1つまたは複数の受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程であって、該受容体結合物質が、(i)該受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii)該組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式で標的細胞の表面上の分子に特異的に結合し、該ストレプトアビジン類似体またはムテインが、アミノ酸の配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対して、SEQ ID NO: 1～6のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンまたはムテインよりも高い親和性を呈し、それによって培養標的細胞が生成される工程

を含む、標的細胞を培養するための方法。

[本発明1121]

受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって組成物中の1つまたは複数の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1119または本発明1120の方法。

[本発明1122]

複数の結合部位が、2つ以上の結合部位Z1を含み；かつ

受容体結合物質が、結合部位Z1に可逆的に結合することができる結合パートナーC1を含み、C1とZ1との間の可逆的結合が、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合をもたらす、
本発明1119～1121のいずれかの方法。

[本発明1123]

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、複数の結合部位Z1を含み、複数の受容体結合物質が、試薬に可逆的に結合されている、本発明1122の方法。

[本発明1124]

標的細胞が免疫細胞を含む、本発明1079～1088および1095～1123のいずれかの方法。

[本発明1125]

標的細胞が血液細胞を含み；

標的細胞が白血球を含み；

標的細胞がリンパ球を含み；

標的細胞がB細胞を含み；

標的細胞がB細胞集団を含み；

標的細胞がT細胞を含み；

標的細胞がT細胞集団を含み；かつ／または

標的細胞がナチュラルキラー（NK）細胞を含む、

本発明1079～1088および1095～1124のいずれかの方法。

[本発明1126]

標的細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、調節性T細胞もしくはその集団、NK細胞もしくはその集団、抗原特異的B細胞もしくはその集団、メモリーB細胞もしくはその集団、または、調節性B細胞もしくはその集団を含む、本発明1079～1088および1095～1125のいずれかの方法。

[本発明1127]

標的細胞がT細胞である、本発明1079～1088および1095～1126のいずれかの方法。

[本発明1128]

分子が、T細胞の表面上に存在し、受容体結合物質が、組成物中のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、本発明1079～1088および1095～1127のいずれかの方法。

[本発明1129]

受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または

受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または

受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、

本発明1079～1088および1095～1128のいずれかの方法。

[本発明1130]

分子が第1の分子であり、受容体結合物質が、1つまたは複数の標的細胞の表面上の第1の分子および第2の分子に特異的に結合することができ、該第2の分子に対する結合が、標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする、本発明1079～1088および1095～1129のいずれかの方法。

[本発明1131]

第2の分子に対する結合が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変することができる、本発明1130の方法。

[本発明1132]

受容体結合物質が第1の受容体結合物質であり、1つまたは複数の標的細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュー

10

20

30

40

50

ションがさらに実行され、該第2の分子に対する結合が、任意で、標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、本発明1079～1088および1095～1129のいずれかの方法。

[本発明1133]

第2の分子に対する結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1132の方法。

[本発明1134]

第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによって組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、本発明1132または1133の方法。

[本発明1135]

第2の分子に対する結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変する、本発明1134の方法。

[本発明1136]

ストレプトアビジンムテインまたは類似体が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、それによって、第2の受容体結合物質がストレプトアビジンムテインまたは類似体に可逆的に結合されている、本発明1132～1135のいずれかの方法。

[本発明1137]

第2の受容体結合物質が、ストレプトアビジン類似体またはムテインに存在する2つ以上の結合部位Z2に可逆的に結合することができる結合パートナーC1またはC2を含む、本発明1136の方法。

[本発明1138]

第2の分子が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または

第2の受容体結合物質が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、本発明1130～1137のいずれかの方法。

[本発明1139]

第2の分子がCD28である、本発明1130～1138のいずれかの方法。

[本発明1140]

第2の分子が、CD40およびCD137の中から選択され；かつ／または

第2の受容体結合物質が、CD40もしくはCD137に特異的に結合する、本発明1130～1138のいずれかの方法。

[本発明1141]

第2の分子が、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、本発明1130～1137のいずれかの方法。

[本発明1142]

第2の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1130～1137および1141のいずれかの方法。

[本発明1143]

第2の受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第2の受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、およびTNFの中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1130～1137、1141、および1142のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1144]

第2の受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1130～1137、1141、および1142のいずれかの方法。

[本発明1145]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1130～1137および1141のいずれかの方法。

10

[本発明1146]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1130～1137および1145のいずれかの方法。

[本発明1147]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1130～1137、1145、および1146のいずれかの方法。

20

[本発明1148]

第2の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、本発明1130～1137および1141のいずれかの方法。

[本発明1149]

第2の受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

30

第2の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1130～1137および1148のいずれかの方法。

[本発明1150]

第2の受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1130～1137、1145、および1146のいずれかの方法。

40

[本発明1151]

接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a（LFA-1）、CD29、CD54（ICAM-1）、CD62L（L-セレクチン）、およびCD29/CD49d（VLA-4）、CD106（VCAM-1）の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1130～1137および1141のいずれかの方法。

[本発明1152]

接着分子が、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1130～1137、1141、および1151のいずれかの方法。

[本発明1153]

因子が核因子である、本発明1130～1137および1141のいずれかの方法。

50

[本発明1154]

因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ (ROR γ) またはROR α である、本発明1130～1137、1141、および1153のいずれかの方法。

[本発明1155]

第2の受容体結合物質が、複数の異なる受容体結合物質を含み、その各々が個々に、組成物中のT細胞の表面上の同じまたは異なる第2の分子に結合して、細胞において1つまたは複数のシグナルを集合的に誘導またはモジュレートすることができる、本発明1010～1078、1085～1094、および1116～1154のいずれかの方法。

[本発明1156]

第1および／または第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊する工程をさらに含む、本発明1001～1155のいずれかの方法。

10

[本発明1157]

破壊が、インキュベーションの開始後14日以内、インキュベーションの開始後12日以内、インキュベーションの開始後10日以内、インキュベーションの開始後8日以内、またはインキュベーションの開始後6日以内に実行される、本発明1156の方法。

[本発明1158]

インキュベーションの少なくとも一部が、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、本発明1001～1157のいずれかの方法。

[本発明1159]

さらなる作用物質が、T細胞、CD4⁺ T細胞、および／またはCD8⁺ T細胞の増殖を増強または誘導することができる、本発明1158の方法。

20

[本発明1160]

さらなる作用物質が、IL-2、IL-15、およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、本発明1158または本発明1159の方法。

[本発明1161]

さらなる作用物質が、CD28に特異的に結合せず、かつ／またはCD28シグナル伝達を誘導しない、本発明1158～1160のいずれかの方法。

[本発明1162]

T細胞または標的細胞が、対象由来の初代細胞である、本発明1001～1161のいずれかの方法。

30

[本発明1163]

T細胞または標的細胞が、対象から直接単離される、本発明1001～1162のいずれかの方法。

[本発明1164]

T細胞が、分画されていないT細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD3⁺ T細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD4⁺ T細胞である、または、濃縮されたかもしくは単離されたCD8⁺ T細胞である、本発明1001～1093および1127～1163のいずれかの方法。

[本発明1165]

インキュベートする工程の前に、T細胞が、CD62L⁺細胞について濃縮されておらず、かつ／またはナイーブT細胞について濃縮されていない、本発明1001～1093および1127～1164のいずれかの方法。

40

[本発明1166]

T細胞または標的細胞が、ヒト細胞である、本発明1001～1165のいずれかの方法。

[本発明1167]

試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、本発明1001～1166のいずれかの方法。

[本発明1168]

50

試薬が、前記インキュベーションの間、固体支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁性粒子、および／もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合されていないかもしくはそれらと会合しておらず；かつ／または

試薬が、柔軟性であり、金属もしくは磁性コアを含有せず、完全にもしくは主に有機多量体から構成されており、球形ではなく、実質的に球形もしくは均一な形状ではなく、かつ／もしくは硬直していない、

本発明1001～1167のいずれかの方法。

[本発明1169]

試薬が、前記インキュベーションの間、支持体または固体支持体に結合されていない、
本発明1001～1168のいずれかの方法。

[本発明1170]

試薬が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体に結合されており、それによって、複数のT細胞または標的細胞が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体上に可逆的に固定化されている、本発明1001～1168のいずれかの方法。

[本発明1171]

支持体が、固定相であるかもしくはそれを含み；かつ／または

支持体が、固体支持体であるかもしくはそれを含む、

本発明1170の方法。

[本発明1172]

各受容体結合物質が個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、およびMHC分子、ならびにそれらの結合断片の中から選択される、本発明1001～1171のいずれかの方法。

[本発明1173]

受容体結合物質が、抗体断片を含み；

受容体結合物質が、Fab断片を含み；

受容体結合物質が、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv)断片の中から選択される二価抗体断片であり；

受容体結合物質が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片であり；かつ／または

受容体結合物質が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ (glubody)、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、およびアビマー (avimer)の中から選択される、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子である、
本発明1001～1172のいずれかの方法。

[本発明1174]

試薬が、ビオチン、ビオチン類似体、もしくはそれらの生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質であるか、あるいはそれを含む、本発明1001～1118および1155～1173のいずれかの方法。

[本発明1175]

試薬が、ビオチンまたは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジ

10

20

30

40

50

ン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含み；

試薬が、ビオチン類似体または生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含み；かつ／または

試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む、

本発明1001～1118および1155～1174のいずれかの方法。

[本発明1176]

試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド（CBP）に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質（MBP）に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質の、オリゴマーまたはポリマーである、本発明1001～1118および1155～1175のいずれかの方法。

[本発明1177]

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、本発明1001～1118および1155～1176のいずれかの方法。

[本発明1178]

試薬が、ストレプトアビジン類似体またはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、本発明1001～1177のいずれかの方法。

[本発明1179]

オリゴマーまたはポリマーの個々の分子が、多糖または二官能性リンカーによって架橋されている、本発明1176、1177、および1178のいずれかの方法。

[本発明1180]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、本発明1174～1179のいずれかの方法。

[本発明1181]

試薬が、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む；または

ストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

10

20

30

40

50

本発明1001～1180のいずれかの方法。

[本発明1182]

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a)SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

(b)SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c)ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、(a)または(b)の機能的断片

を含む、本発明1001～1118および1155～1181のいずれかの方法。

[本発明1183]

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として117、120、および／または121に対応する位置に、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、本発明1181または本発明1182の方法。

[本発明1184]

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121、もしくはPhe121の中から選択される；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121の1つもしくは複数から選択される；または

アミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121から選択される、本発明1183の方法。

[本発明1185]

ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a)SEQ ID NO: 27または28に示されるアミノ酸の配列；

(b)SEQ ID NO: 28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰、およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c)ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、(a)または(b)の機能的断片

を含む、本発明1119～1184のいずれかの方法。

[本発明1186]

試薬が、ストレプトアビジン類似体またはムテインであるかまたはそれを含み；かつ

結合パートナーC1および／または結合パートナーC2が、独立して、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを含む、

本発明1001～1118および1155～1185のいずれかの方法。

[本発明1187]

前記破壊が、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の、細胞への導入を含む、本発明1001～1078および1156～1186のいずれかの方法。

[本発明1188]

物質が、遊離の結合パートナーであり、かつ／または競合物質である、本発明1187の方法。

[本発明1189]

組成物中の物質が、T細胞または標的細胞に対して有害ではなく、かつ／または、該物質の添加が、生存するT細胞または標的細胞のパーセンテージを、該物質を伴わない同等の条件または同じ条件下でのそれぞれT細胞または標的細胞のインキュベーションと比較した際に、90%、80%、70%、60%、または50%未満に低減させない、本発明1187または本発明1188の方法。

10

[本発明1190]

前記破壊が、T細胞または標的細胞において、受容体結合物質または第2の受容体結合物質の一方または両方によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる、本発明1001～1078および1156～1189のいずれかの方法。

[本発明1191]

試薬が、ストレプトアビジン類似体もしくはムテインまたはそれらの生物学的に活性な断片であるか、またはそれを含み；かつ

20

物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、本発明1001～1190のいずれかの方法。

[本発明1192]

物質が、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

30

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドであり；かつ／または

物質が、C1もしくはその類似体であるか、またはC2もしくはその類似体である、本発明1191の方法。

[本発明1193]

前記結合部位Z1と前記結合パートナーC1との間の可逆的結合、および／または前記結合部位Z2と前記結合パートナーC2との間の可逆的結合の解離定数 (K_D) が、 10^{-2} M～ 10^{-13} Mの範囲である、

本発明1001～1192のいずれかの方法。

40

[本発明1194]

インキュベーションの前に、細胞を、組成物のT細胞もしくは標的細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質と接触させ、それによってT細胞もしくは標的細胞を含む組成物が生成もしくは取得される；または

インキュベーションの少なくとも一部が、さらに、組成物のT細胞もしくは標的細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質の存在下で実行され、培養T細胞が、マーカーを含むT細胞もしくは標的細胞について濃縮される、

本発明1001～1193のいずれかの方法。

[本発明1195]

選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位をさらに含む試

50

薬に可逆的に結合されている；または

選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位を含むさらなる試薬に可逆的に結合されている、

本発明1194の方法。

[本発明1196]

シグナルの誘導またはモジュレーションが、シグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、培養T細胞の増大および／または活性化における増加をもたらす、本発明1001～1195のいずれかの方法。

[本発明1197]

増加が、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍であるか、またはそれを上回る、本発明1196の方法。

10

[本発明1198]

追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションが、追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、T細胞の増大および／または活性化を増加させる、本発明1007～1197のいずれかの方法。

[本発明1199]

増加が、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍であるか、またはそれを上回る、本発明1198の方法。

[本発明1200]

20

インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、インキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のT細胞と各々比較して、組成物中のT細胞の増大および／もしくは増殖を増加させる、組成物中のT細胞の代謝プロファイルを変更する、組成物中のCD8⁺ T細胞のサブセットを変更し；かつ／または、組成物中の長命メモリーT細胞のパーセンテージを増加させる、本発明1001～1199のいずれかの方法。

[本発明1201]

CD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、またはCD8⁺細胞の数またはパーセンテージが、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、またはCD8⁺ T細胞の数またはパーセンテージとそれぞれ比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞；

30

組成物中のCD8⁺ T細胞の比率、またはCD8⁺ T細胞の相対比率もしくは正規化比率が、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD8⁺ T細胞の比率、または相対比率もしくは正規化比率と比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞；

40

組成物中のCD62L⁺、任意で長命メモリーT細胞、またはメモリー幹細胞 (T_{SCM}) の数またはパーセンテージが、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD62L⁺、長命メモリーT細胞、またはT_{SCM}のいずれかの対応する細胞の集団の数またはパーセンテージと比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞を結果としてもたらす、本発明1001～1200のいずれかの方法。

[本発明1202]

50

培養T細胞が、組成物中の全T細胞に対するまたは組成物中の全細胞に対するパーセンテージとして35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、または90%を上回る、CD62Lについて表面が陽性（CD62L+）である表現型を含むT細胞サブセットを含む、本発明1001～1201のいずれかの方法。

[本発明1203]

T細胞サブセットが、

(a)CD127+；ならびに／または

(b)CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちのいずれか1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+、およびLFA-1+のうちのいずれか1つまたは複数

を含む表現型をさらに含む、本発明1202の方法。

[本発明1204]

T細胞サブセットが、

(a)低レベルのTCR再構成切除サークル（TREC）を含み；かつ／または

(b)任意でKi-67である増殖マーカーを発現しており；かつ／または

(c)刺激物質の存在下で増殖する能力を呈し；かつ／または

(d)刺激物質の存在下でIFN-γ、TNF、およびIL-2の中から選択されるサイトカインを産生する能力を呈する、

本発明1202または本発明1203の方法。

[本発明1205]

刺激物質が、抗原、恒常性サイトカイン、任意でIL-15および／もしくはIL-17であるか、または、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる作用物質である、本発明1204の方法。

[本発明1206]

T細胞サブセットが、長命メモリーT細胞であるかまたはそれを含む、本発明1202～1205のいずれかの方法。

[本発明1207]

T細胞サブセットが、Tメモリー幹細胞（T_{SCM}）であるかまたはそれを含む、本発明1202～1206のいずれかの方法。

[本発明1208]

集団のT細胞または標的細胞に組換え核酸分子を導入する工程をさらに含み、核酸分子が組換えタンパク質をコードし、それによって、細胞が組換えタンパク質を発現する、本発明1001～1207のいずれかの方法。

[本発明1209]

組換え受容体が、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体（TCR）である、本発明1208の方法。

[本発明1210]

インビトロまたはエキスピボで行われる、本発明1001～1209のいずれかの方法。

[本発明1211]

培養細胞を、疾患または状態を有する対象に投与する工程をさらに含む、本発明1001～1210のいずれかの方法。

[本発明1212]

本発明1001～1211のいずれかの方法によって産生された複数の培養T細胞または標的細胞、および任意で、薬学的に許容される賦形剤を含む、組成物。

[本発明1213]

物質の添加後に、細胞が、30℃よりも高い温度で24時間超、48時間超、72時間超、または96時間超にわたって、インビトロまたはエキスピボでインキュベートされていない、本発明1212の組成物。

[本発明1214]

(a)受容体結合物質に結合することができる複数の結合部位を含む、試薬；および

10

20

30

40

50

(b)(i) 試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)T細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の分子に特異的に結合することができ、該分子がCD28、CD3、またはCD40ではない、受容体結合物質を含む、製造物品。

[本発明1215]

分子への結合が、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のT細胞におけるシグナルを誘導もしくはモジュレートし；かつ／または

分子への結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化する、本発明1215の製造物品。

[本発明1216]

分子が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、本発明1214または本発明1215の製造物品。

[本発明1217]

分子がCD137ではない、本発明1130～1132のいずれかの製造物品。

[本発明1218]

受容体結合物質が、サイトカイン受容体に特異的に結合する、ケモカイン受容体に特異的に結合する、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、本発明1217の製造物品。

[本発明1219]

受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1214または本発明1218の製造物品。

[本発明1220]

受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、およびTNFR2の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、およびTNFの中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1214、1218、および1219のいずれかの製造物品。

[本発明1221]

受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1214および1218～1220のいずれかの製造物品。

[本発明1222]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132 (IL受容体共通 γ 鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、本発明1214または本発明1218の製造物品。

[本発明1223]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132 (IL受容体共通 γ 鎖)の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、

本発明1214、1218、および1222のいずれかの製造物品。

[本発明1224]

第2の受容体結合物質が、IL-7R、IL-21R、およびCD132 (IL受容体共通 γ 鎖)の中から

10

20

30

40

50

選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する；または

第2の受容体結合物質が、IL-7、IL-21、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1214、1218、1222、および1223のいずれかの製造物品。

[本発明1225]

受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、本発明1214または本発明1218の製造物品。

[本発明1226]

受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1214、1218、および1225のいずれかの製造物品。

[本発明1227]

受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、
本発明1214、1218、1225、および1226のいずれかの製造物品。

[本発明1228]

接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1214または本発明1218の製造物品。

[本発明1229]

接着分子が、LFA-1、L-セレクチン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、本発明1214、1218、および1228のいずれかの製造物品。

[本発明1230]

因子が核因子である、本発明1214または本発明1218の製造物品。

[本発明1231]

因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ (ROR γ) またはROR α である、本発明1214、1218、および1230のいずれかの製造物品。

[本発明1232]

(a)作用物質に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬であって、該ストレプトアビジン類似体またはムテインが、正味の負電荷を含む、または、SEQ ID NO: 4もしくは6に示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンムテインの等電点よりも低い等電点を呈し、かつ／または、アミノ酸の配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対して、SEQ ID NO: 4もしくは6のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンもしくはムテインよりも高い親和性を呈する、試薬；および

(b)(i)該試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる、作用物質を含む、製造物品。

[本発明1233]

受容体結合物質または作用物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質または作用物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、
本発明1214～1232のいずれかの製造物品。

[本発明1234]

作用物質が、選択物質または受容体結合物質である、本発明1214～1233のいずれかの製造物品。

[本発明1235]

作用物質が、

TCR/CD3複合体のメンバー、CD3、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるかもしくはそれを含む、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、または、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、分子に特異的に結合する受容体結合物質である、本発明1234の製造物品。

10

[本発明1236]

受容体結合物質が第2の受容体結合物質であり、分子が第2の分子であり、かつ、試薬が、
(c)第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位、および
(d)(i)試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii)T細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質をさらに含む、本発明1214～1235のいずれかの製造物品。

[本発明1237]

作用物質または第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し、かつ／または、第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、本発明1232または本発明1236の製造物品。

20

[本発明1238]

(i)第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が各々個々に、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む；または

(ii)第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む；または

30

(iii)第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1、および、各々が結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む、
本発明1236または本発明1237の製造物品。

[本発明1239]

試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、
本発明1214～1238のいずれかの製造物品。

40

[本発明1240]

試薬が、支持体または固体支持体に結合されていない、本発明1214～1239のいずれかの製造物品。

[本発明1241]

試薬が、支持体に結合されているかまたは固定化されている、本発明1214～1240のいずれかの製造物品。

[本発明1242]

支持体が、固体支持体または固定相である、本発明1241の製造物品。

[本発明1243]

50

支持体が、ビーズ、粒子、ナノ粒子、またはマイクロスフェアを含む、本発明1241または本発明1242の製造物品。

[本発明1244]

作用物質が個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、およびそれらの結合断片の中から選択される、本発明1214～1243のいずれかの製造物品。

[本発明1245]

抗体断片が、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv)断片の中から選択される二価抗体断片、または、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片である、本発明1214～1244のいずれかの製造物品。

10

[本発明1246]

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれらを含む；または

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、

本発明1214～1245のいずれかの製造物品。

[本発明1247]

本発明1214～1246のいずれかの製造物品、および任意で使用説明書を含む、キット。

20

[本発明1248]

受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質をさらに含む、本発明1247のキット。

[本発明1249]

標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物であって、

組成物中の全T細胞または組成物中の全細胞に対するパーセンテージとして35%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を上回る細胞が、CD3+、CD4+またはCD8+、およびCD62L+、ならびに、CD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちの1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+、およびLFA-1+のうちの1つまたは複数である表面表現型を含むT細胞サブセットを含み；かつ

30

(a) 遺伝子操作前にまたは遺伝子操作の間、該T細胞サブセットを含む複数のT細胞が：

(i) GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされなかった；

(ii) 組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15の存在下で、インキュベートされなかった；もしくは

(iii) CD62L+細胞について濃縮されなかった；または

(b) 組成物が、GSK-P阻害剤、または組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15を含まない

のいずれかまたは両方である、組成物。

[本発明1250]

T細胞サブセットが、少なくとも 5×10^6 個、少なくとも 1×10^6 個、または少なくとも 2×10^6 個の細胞を含む、本発明1251の組成物。

40

[本発明1251]

標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物であって、

遺伝子操作されたT細胞が、CD3+、CD4+またはCD8+、およびCD62L+、ならびに、CD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちの1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+、およびLFA-1+のうちの1つまたは複数である表面表現型を含むT細胞サブセットを含むT細胞の集団の形質導入に由来し、該T細胞サブセットが、該集団中の全T細胞に対し、

50

(a)該表現型を含む1つもしくは複数のマーカーの表面発現に基づいてヒト対象から単離されたかもしくは濃縮された、初代T細胞を含む集団；または

(b)GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされたT細胞の集団；

(c)組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15の存在下でインキュベートされたT細胞の集団；または

(d)抗CD3および抗CD8によって刺激されたが、刺激もしくは活性化が1日、2日、3日、4日、もしくは5日を上回る期間にわたり、かつ／または刺激がビオチンもしくはビオチン類似体の存在下で妨害されなかった、T細胞の集団

のいずれかと比較して、より大きなパーセンテージで存在するかまたはより多い数で存在する、組成物。

[本発明1252]

T細胞サブセットが、前記集団中の全T細胞に対するパーセンテージとして35%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%を上回ってまたは約35%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、もしくは約90%を上回って、該集団に存在する；または

T細胞サブセットが、少なくとも細胞 5×10^6 個、 1×10^6 個、 2×10^6 個、もしくはそれよりも多くを含む、

本発明1251の組成物。

[本発明1253]

薬学的組成物である、本発明1249～1252のいずれかの組成物。

[本発明1254]

本発明1212、1213、および1249～1253のいずれかの組成物を、疾患または状態を有する対象に投与する工程を含む、処置の方法。

[本発明1255]

細胞が、組換え受容体、キメラ抗原受容体、またはTCRを含み、かつ、組換え受容体、キメラ抗原受容体、またはトランスジェニックTCRが、疾患または状態と関連する抗原に特異的に結合する、本発明1254の処置の方法。

[本発明1256]

疾患または状態が、がん、および自己免疫性の疾患もしくは障害、または感染性疾患である、本発明1254または本発明1255の処置の方法。

【図面の簡単な説明】

【0158】

(図1) 図1(A～E)は、例示的な実施態様の概略図を提供する。

図1Aは、作用物質への可逆的結合のための複数の結合部位を有する試薬(またはその代表部分)の概略図を示す。この場合、試薬は2つの作用物質に可逆的に結合することができるものとして示されており、作用物質のそれぞれは、細胞上の分子に特異的に結合することができる。この試薬は、複数の結合部位Z1を含めて、複数の結合部位を有し、それぞれが作用物質に可逆的に結合することができる。示した概略図では、第1および第2の作用物質は、場合によって同じでもよく、それぞれが少なくとも1つの結合パートナーC1を含む。結合パートナーC1は結合部位Z1に可逆的に結合する。第1および第2の作用物質は、それぞれ、結合部位B2をも含み、結合部位B2は細胞の表面上の分子に特異的に結合することができ、該分子は、ある場合には、同じ細胞上にあり得る。ここでは、第1および第2の作用物質が、同じ細胞上の複数の分子に特異的に結合するように示されている。

図1Bは、第1および第2の作用物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を有する試薬の概略図を示し、第1および第2の作用物質は、それぞれ、第1および第2の細胞上の分子に特異的に結合することができる。この試薬は複数の結合部位Z1を有し、それぞれが作用物質に可逆的に結合することができる。第1および第2の作用物質は、場合によって同じでもよく、それぞれが結合パートナーC1を含み、結合パートナーC1は結合部位Z1に可逆的に結合する。第1および第2の作用物質はそれぞれ結合部位B2を含み、結合部位B2は細胞の表面上の分子に特異的に結合することができ、該分子は、場合によって、同じ細胞または異なる細胞上にあり得る。ここでは、第1の作用物質が第1の細胞の表面上の分子に結

10

20

30

40

50

合しており、第2の作用物質が第2の細胞の表面上の分子に結合している。

図1Cは、第1および第2の作用物質に可逆的に結合することができる試薬を示し、第1および第2の作用物質は、それぞれ、第1および第2の細胞上の分子に特異的に結合することができる。この試薬は、複数の結合部位Z1およびZ2を有し、これらは同じでも異なってもよく、それぞれが作用物質の一方または両方に可逆的に結合することができる。第1の作用物質は、Z1に可逆的に結合する結合パートナーC1を含む；第2の作用物質は、Z2に可逆的に結合することができる結合パートナーC2を含む。ある場合には、C1およびC2は異なる。ある場合には、C1およびC2は同じまたは実質的に同じである。第1の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる結合部位B1を含み、第2の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位B3を含む。結合部位B1およびB3は、場合によって、2つの異なる細胞表面分子、または単一分子上の異なるエピトープ、または異なる細胞の表面上の同じもしくは異なる分子に結合する。ここでは、第1の作用物質が第1の細胞の表面上の分子に、B1を介して結合しているとして示されており、第2の作用物質は第2の細胞の表面上の分子に、B3を介して結合している。

10

図1Dは、選択物質のような、第1および第2の作用物質に可逆的に結合することができる試薬を示し、第1および第2の作用物質は、それぞれ、細胞上の分子に特異的に結合することができる。この試薬は、Z1およびZ2を含む複数の結合部位を有し、これらは同じでも異なってもよく、それぞれが作用物質に可逆的に結合することができる。第1の作用物質は、結合部位Z1に特異的に結合することができる結合パートナーC1を含み、第2の作用物質は、結合部位Z2に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合パートナーC2を含む。ある場合には、C1およびC2は異なる。ある場合には、C1およびC2は同じまたは実質的に同じである。第1の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる結合部位B1を含み、第2の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる結合部位B3を含む。いくつかの態様では、第1の作用物質および第2の作用物質は選択物質であり得る。結合部位B1およびB3は、1個の細胞の表面上の同じもしくは異なる分子(例えば、受容体)、1つの分子上の同じもしくは異なるエピトープ、または異なる細胞の表面上の同じもしくは異なる分子に結合することができる。ここでは、第1の作用物質は細胞の表面上の第1の分子に結合しており、第2の作用物質は同じ細胞の表面上の第2の分子に結合している。

20

図1Eは、第1および第2の作用物質に可逆的に結合された試薬を示し、これらの作用物質は、それぞれ、細胞上の分子に特異的に結合することができる。この試薬は、Z1およびZ2を含む複数の結合部位を有し、これらは同じでも異なってもよく、それぞれが作用物質に可逆的に結合することができる。第1の作用物質は、試薬のZ1に可逆的に結合することができる結合パートナーC1を含み、第2の作用物質は、Z2に可逆的に結合することができる結合パートナーC2を含む。ある場合には、C1およびC2は異なる。ある場合には、C1およびC2は同じまたは実質的に同じである。第1の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位B2を含み、第2の作用物質は、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位B4を含む。いくつかの態様では、第1の作用物質および第2の作用物質は刺激物質であり得る。結合部位B2およびB4は、1個の細胞の表面上の同じもしくは異なる分子、1つの分子上の同じもしくは異なるエピトープ、または異なる細胞の表面上の同じもしくは異なる分子に結合することができる。ここでは、第1の作用物質は細胞の表面上の第1の分子に結合しており、第2の作用物質は同じ細胞の表面上の第2の分子に結合している。

30

40

(図2) 図2(A~E)は、図2A~2Eを含み、図1A~1Eに示された例示的な実施態様の概略図を提供するが、ここでは、描かれた試薬が固定相のような支持体上に固定化されているとして示されている。

(図3) 図3は、オリゴマー試薬を用いて刺激物質を多量体化し、得られた複合体を細胞とインキュベートして細胞にシグナルを送達し、続いて、その結合を逆転させる例示的な実施態様の概略図を示す。パネルAはオリゴマー試薬1を示し、この試薬1は支持体に結合されておらず、柔軟性であるとして示されている。ここではFabフラグメントとして

50

示されて、細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる刺激物質2が、該試薬と組み合わせられる。この刺激物質は、刺激物質を多量体化する試薬上の結合部位(例えば、結合部位Z)に可逆的に結合することができる、結合パートナー(例えば、結合パートナーC)を含む。パネルBは、試薬上の結合部位に可逆的に結合している結合パートナーを示す。細胞3がこのシステムに加えられる。パネルCは、細胞3の表面上の分子4に特異的に結合している、多量体化された刺激物質(Fabフラグメント)を示す。パネルCに描かれた刺激物質は、刺激性の受容体結合物質(例えば、第1の受容体結合物質および/または第2の受容体結合物質)であり、これは、細胞上の分子への刺激物質の結合時に、該細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる。パネルDに示されるように、競合試薬(例えば、ビオチン)のような物質5がこの組成物に添加され、これは、刺激物質上の結合パートナーに対してよりも試薬上の結合部位に対してより高い結合親和性を示し、それによって試薬1と刺激物質2との間の可逆的結合を破壊する物質であり得る。場合によっては、刺激物質、例えばFabフラグメントもまた、細胞3上の分子4との相互作用から解離させることができる。ある場合には、これは、細胞内のシグナル伝達を妨害し、減少させ、かつ/または終結させることができる。

10

(図4) 図4は、固体支持体、または固定相を含む表面などの、支持体に取り付けられた可逆的システムの例示的な実施態様の概略図を提供する。パネルAは、試薬1を含む支持体6を示す。細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる、Fabフラグメントなどの作用物質2がこのシステムに添加される。作用物質2、例えばFabフラグメントは、試薬上の結合部位(例えば、結合部位Z)に可逆的に結合することができる結合パートナー(例えば、結合パートナーC)を含む。パネルBは、試薬上の結合部位に可逆的に結合している結合パートナーを示す。細胞3がこのシステムに添加される。パネルCは、細胞3の表面上の分子4に結合している作用物質2、例えばFabフラグメントを示す。いくつかの態様では、scFvが受容体結合物質または選択物質を構成する。いくつかの態様では、作用物質、例えばFabフラグメントは、受容体結合物質または選択物質であり得る。パネルCは、例示的な受容体結合物質(例えば、第1の受容体結合物質および/または第2の受容体結合物質)を示し、これは、細胞上の分子への該受容体結合物質、例えばFabフラグメント、の結合時に、該細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる。競合試薬(例えば、ビオチン)のような物質5が添加され、これは、作用物質、例えばFabフラグメント上の結合パートナーに対してよりも試薬上の結合部位に対してより高い結合親和性を示し、それによって試薬と作用物質との間の結合を破壊する物質であり得る。パネルDは、作用物質2、例えばFabフラグメントと試薬との間の結合の破壊を示し、それによって、作用物質からの、したがって細胞からの試薬の解離が生じる。場合によっては、作用物質、例えばFabフラグメントも、細胞3上の分子4との相互作用から解離させることができる。ある場合には、これは、細胞内のシグナル伝達を妨害し、減少させ、かつ/または終結させることができる。

20

30

(図5) 図5(A~C)は、オリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるT細胞の刺激後のT細胞増大に及ぼすD-ビオチンの添加の一時的効果を示す。図5A: 細胞培養中のD-ビオチン添加および培地交換の時点を含む実験条件および時系列の概略図である。図5B: 異なる時点でのD-ビオチンの添加を含めて、示された条件下での刺激後のCD3⁺、CD4⁺、およびCD8⁺細胞の総細胞計数(増大の程度)を示す。比較のため、破線の水平線は、陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大されたCD3⁺、CD4⁺またはCD8⁺細胞の数を示す。図5C: 非刺激対照に対して正規化した場合のCD4⁺およびCD8⁺の倍増大を示す。

40

(図6A) 図6(A~D)は、刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD3⁺ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図6A: 細胞培養中のD-ビオチン添加および培地交換の時点を含む実験条件および時系列の概略図である。

(図6B) 図6(A~D)は、刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD3⁺ T細胞の短

50

期活性化から生じる特徴を示す。図6B: 示された条件下で7日目の培養物における総細胞計数(増大の程度)を示す。破線の水平線は、D-ビオチン添加なしの抗CD3/抗CD28ビーズ陽性対照において増大された細胞の数を示す。

(図6C) 図6(A~D)は、刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD3+ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図6C: 図6Bの培養物におけるCD4+およびCD8+細胞の割合を示す。破線の水平線は、D-ビオチン添加なしの陽性対照におけるCD4+およびCD8+細胞の画分を示す。

(図6D) 図6(A~D)は、刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD3+ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図6D: 非刺激対照におけるCD4+またはCD8+細胞の数に対して正規化されたCD4+またはCD8+細胞の数を示す。水平線は、D-ビオチン添加なしの陽性抗CD3/抗CD28ビーズ対照において増大されたCD4+またはCD8+細胞の数を表す。

(図6E) 図6E: 示された条件について7日目の培養物におけるCD4+およびCD8+ T細胞集団の両方についてのCD62LおよびCD127表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

(図6F) 図6F: 示された条件について7日目の培養物におけるCD4+およびCD8+ T細胞集団の両方についてのKi-67およびT-bet発現のフローサイトメトリー分析を示す。ST-MMは、抗CD3/抗CD28 Fab多量体化ムテインストレプトアビジン作用物質である。

(図7A) 図7(A~C)は、図6Aに記載された実験条件および時系列を用いて刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD8+ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図7A: 示された条件下で7日目の培養物におけるCD8+細胞計数(増大の程度)を示す。破線の水平線は、D-ビオチン添加なしの抗CD3/抗CD28ビーズ陽性対照において増大された細胞の数を示す。

(図7B) 図7(A~C)は、図6Aに記載された実験条件および時系列を用いて刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD8+ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図7B: 示された条件について7日目の培養物におけるCD62LおよびCD127表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

(図7C) 図7(A~C)は、図6Aに記載された実験条件および時系列を用いて刺激の開始1日後にD-ビオチンが加えられたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28 FabによるCD8+ T細胞の短期活性化から生じる特徴を示す。図7C: 示された条件について7日目の培養物におけるKi-67およびT-bet発現のフローサイトメトリー分析を示す。ST-MMは、抗CD3/抗CD28 Fab多量体化ムテインストレプトアビジン作用物質である。

(図8A) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8A: 示された条件下で6日目の培養物における細胞計数(増大の程度)を示す。破線の水平線は、陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大された細胞の数を示す。

(図8B) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8B: 示された条件下で6日目の培養物における非刺激対照に対して正規化されたCD4+またはCD8+細胞の数を示す。陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大され得られたCD4+またはCD8+細胞数を、破線の水平線によって示されるように100%に設定した。

(図8C) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8Cおよび8D: 示された条件について6日目のCD3+細胞培養物内のCD62L+/CD4+ (図8C)またはCD62L+/CD8+ (図8D)細胞のいずれかの正規化数を示す。陽性対照(抗CD3/

10

20

30

40

50

抗CD28ビーズ)において増大され得られたCD62L+/CD4+またはCD62L+/CD8+細胞数を、水平線によって示されるように100%に設定した。

(図8D) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8Cおよび8D: 示された条件について6日目のCD3+細胞培養物内のCD62L+/CD4+ (図8C)またはCD62L+/CD8+ (図8D)細胞のいずれかの正規化数を示す。陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大され得られたCD62L+/CD4+またはCD62L+/CD8+細胞数を、水平線によって示されるように100%に設定した。

(図8E) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8Eおよび図8F: 示された条件下で6日間培養された例示的CD3+細胞内のCD4+ (図8E)またはCD8+ (図8F)細胞のいずれかにおけるCD62LおよびCD69表面発現またはCD45ROおよびCD45RA表面発現のフローサイトメトリー分析を描く。

(図8F) 図8(A~F)は、抗CD3 Fabおよびさまざまな共刺激分子によって可逆的に結合されたオリゴマームテインストレプトアビジン試薬によるCD3+ T細胞の刺激から生じる特徴を示す。図8Eおよび図8F: 示された条件下で6日間培養された例示的CD3+細胞内のCD4+ (図8E)またはCD8+ (図8F)細胞のいずれかにおけるCD62LおよびCD69表面発現またはCD45ROおよびCD45RA表面発現のフローサイトメトリー分析を描く。

(図9A) 図9(A~D)は、各々が抗CD3および抗CD28によって可逆的に結合された、オリゴマームテインストレプトアビジン((Strep-Tactin(登録商標); ST-MM A))試薬またはオリゴマームテインストレプトアビジン(Strep-Tactin(登録商標) XT; ST-MM B)試薬のいずれかによるCD3+ T細胞の刺激から得られる特徴を示す。図9A: 示された条件下で5日目の培養物における細胞計数(増大の程度)を示す。破線の水平線は、陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大された細胞の数を示す。

(図9B) 図9(A~D)は、各々が抗CD3および抗CD28によって可逆的に結合された、オリゴマームテインストレプトアビジン((Strep-Tactin(登録商標); ST-MM A))試薬またはオリゴマームテインストレプトアビジン(Strep-Tactin(登録商標) XT; ST-MM B)試薬のいずれかによるCD3+ T細胞の刺激から得られる特徴を示す。図9B: 図9Aの培養物におけるCD4+およびCD8+細胞の割合を示す。破線の水平線は、陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)におけるCD4+およびCD8+細胞の画分を示す。

(図9C) 図9(A~D)は、各々が抗CD3および抗CD28によって可逆的に結合された、オリゴマームテインストレプトアビジン((Strep-Tactin(登録商標); ST-MM A))試薬またはオリゴマームテインストレプトアビジン(Strep-Tactin(登録商標) XT; ST-MM B)試薬のいずれかによるCD3+ T細胞の刺激から得られる特徴を示す。図9C: 非刺激対照におけるCD4+またはCD8+細胞の数に対して正規化されたCD4+またはCD8+細胞の数を示す。水平線は、陽性抗CD3/抗CD28ビーズ対照において増大されたCD4+またはCD8+細胞の数を表す。

(図9D) 図9(A~D)は、各々が抗CD3および抗CD28によって可逆的に結合された、オリゴマームテインストレプトアビジン((Strep-Tactin(登録商標); ST-MM A))試薬またはオリゴマームテインストレプトアビジン(Strep-Tactin(登録商標) XT; ST-MM B)試薬のいずれかによるCD3+ T細胞の刺激から得られる特徴を示す。図9D: 示された条件について5日目の培養物におけるCD62LおよびCD69表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

(図10) 図10(A~B)は、各々が抗CD3および抗CD28によって可逆的に結合された、オリゴマームテインストレプトアビジン((Strep-Tactin(登録商標); ST-MM A))試薬またはオリゴマームテインストレプトアビジン(Strep-Tactin(登録商標) XT; ST-MM B)試薬のいずれかによるCD8+ T細胞の刺激から得られる特徴を示す。図10A: 示された条件下で6日目の培養物における細胞計数(増大の程度)を示す。破線の水平線は、陽性対照(抗CD3/抗CD28ビーズ)において増大された細胞の数を示す。図10B: 示された条件について6日目の培養物におけるCD62L、CD69およびCD8表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

(図11A) 図11(A~C)は、ストレプトアビジンmテインStrep-tactin(登録商標)被覆ビーズ上に可逆的に固定化されたαCD3 FabおよびαCD28 Fabフラグメントを用いてイ

10

20

30

40

50

ンビトロで刺激した後に、CD3+ Tレスポonder細胞を増殖させた実験の結果を示す。図11Aは、刺激された細胞のサイズ分布(前方散乱)を示すヒストグラムである。

(図11B) 図11(A~C)は、ストレプトアビジンムテインStrep-tactin(登録商標)被覆ビーズ上に可逆的に固定化された α CD3 Fabおよび α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した後に、CD3+ Tレスポonder細胞を増殖させた実験の結果を示す。図11Bは、図11Bの最上部に示される細胞分裂ごとの細胞数に応じた増殖の程度を表すヒストグラムを示す(0は非分裂細胞を表し、5は少なくとも5回の分裂を繰り返した細胞を表す)。

(図11C) 図11(A~C)は、ストレプトアビジンムテインStrep-tactin(登録商標)被覆ビーズ上に可逆的に固定化された α CD3 Fabおよび α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した後に、CD3+ Tレスポonder細胞を増殖させた実験の結果を示す。図11Cは、4日間の刺激後の培養皿の写真を示す。

(図12) 図12(A~D)は、可溶性試薬として作用する可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された可逆的 α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した後に、CD3+ Tレスポonder細胞を増殖させた実験の結果を示す。結果を図12に示した実験の場合には、300,000個のCD3+レスポonderT細胞(Tresp)を、2 μ Mのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識し、 α CD3 Fabフラグメントと α CD28 Fabフラグメント(両方とも重鎖にストレプトアビジン結合ペプチドとしてStrep-tagを保有する)との組み合わせが固定化された、様々な量の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン調製物により刺激した。(「1 $\times$ 」は0.5 μ gの α CD3 Fabと0.5 μ gの α CD28 Fabで機能化された3 μ gのオリゴマーストレプトアビジンムテインに相当する；数字は「1 $\times$ 」の倍量を示す)。Tresp細胞は非刺激状態のままであったか、または陰性対照として用いたブランクのオリゴマーストレプトアビジンムテイン(Fabなし)により刺激した。Tresp細胞を、20U/mlのインターロイキン2(IL-2)を補充した1mlの細胞培養培地中に300,000個のCD3陰性自己支持細胞(30Gy照射したもの)と共に48ウェルプレートに2つ組で播種した。細胞を培地交換せずに37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、増殖を5日後にFACS分析でCFSE希釈により分析した(図12B)。図12Aは、培養5日後の細胞のサイズ分布を示す。ヒストグラムは生存CD3+細胞を示し、一方、図12Cは、1mMのD-ビオチンで処理して洗浄した後に、刺激試薬から遊離した培養後の細胞を示す。単量体Fabフラグメントの解離と除去は、蛍光標識としてフィコエリトリンで標識したオリゴマーストレプトアビジンムテイン(ST-PE)を用いて再染色することにより分析され、代表的なヒストグラムが示される。図12Dは、5日後の生存(トリパンプブルー陰性)細胞の絶対数をノイバウエル計算盤(Neubauer counting chamber)でカウントし、それぞれの刺激条件に対してプロットしたグラフを示す。中央値細胞数が図12Dに示される；エラーバーは標準偏差(SD)を示す。図12Eは、5日間の刺激後の培養皿の写真を示す。

(図13) 図13(A~B)は、可溶性試薬として作用する2種類の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントまたは α CD3/ α CD28/ α CD8 Fabのいずれかを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD4+およびCD8+ Tレスポonder細胞(Tresp)の増殖の増大動態を示す。第1の種類のオリゴマーストレプトアビジンムテインは、実施例3で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分(n $\geq$ 3)であった(本明細書では、「従来の」または「より小さい」オリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格とも呼ばれ、図13(A~B)に頂点が下にある三角形の記号で示される)；可溶性試薬として使用される、このオリゴマーストレプトアビジンムテインの第2の種類は、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインをビオチン化ヒト血清アルブミン(HSA)と反応させることによって得られたオリゴマーであった。このHSAベースの可溶性試薬は、本明細書では「より大きな」オリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格とも呼ばれる。図13(A~B)の実験では、培地を交換せずに増大させた。CD4+ Tレスポonder細胞の結果を図13Aに示し、CD8+ Tレスポonder細胞の結果を図13Bに示す。これに関連して、第1の作用物質、任意で第2および第3の作用物質に可逆的に結合させることによって機能化された、実験的に使用される可溶性試薬は、図中では「多量体化作用物質」と呼ばれることに留意されたい。

10

20

30

40

50

(図14) 図14(A~B)は、可溶性試薬として作用する2種類の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインで可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD4+およびCD8+ Tレスポnder細胞(Tresp)の増殖の増大動態を示す。第1の種類のオリゴマー-Strep-tactin(登録商標)は、実施例3で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分($n \geq 3$)であった(本明細書では、「従来のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格」とも呼ばれ、図14(A~B)に頂点が上にある三角形の記号で示される)；可溶性試薬として使用される、このオリゴマーストレプトアビジンムテインの第2の種類は、HSAベースの可溶性試薬、上述の「大きな骨格」であった。図14(A~B)の実験では、培地を交換して増大させた。CD4+ Tレスポnder細胞の結果を図14Aに示し、CD8+ Tレスポnder細胞の結果を図14Bに示す。

10

(図15) 図15(A~B)は、精製済みのCD4+およびCD8+ Tレスポnder細胞の増殖の増大動態についての図13および図14で得られた結果からの結合データを示し、図15AはCD4+ T細胞の結果を示し、図15BはCD8+ T細胞の結果を示す。直線は、3日目に培地交換を行った培養に使用され、一方点線は、3日目に培地交換を行わないで得られた増大の程度の値を示す。図15(A~B)に示されるデータは、投入細胞数に対して正規化される。オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)で刺激したTresp、市販の抗CD3/抗CD28ビーズ(陽性対照)で刺激したTresp、および非刺激T細胞(陰性対照)についてのデータのみが示されており、「大きな骨格」を有する試薬に関するデータは示されていない。

(図16A) 図16(A~C)は、実施例3に記載される可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロでポリクローナルに刺激した、CD3+セントラルメモリーT細胞(T_{CM}) (CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM})の増大動態および表現型を示す。図16(A~C)に示されるグラフは、時点ごとに採取された細胞の数に応じた増殖の程度を表し、図16AはIL-2のみを補充した培地での増殖を示す。

20

(図16B) 図16(A~C)は、実施例3に記載される可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロでポリクローナルに刺激した、CD3+セントラルメモリーT細胞(T_{CM}) (CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM})の増大動態および表現型を示す。図16(A~C)に示されるグラフは、時点ごとに採取された細胞の数に応じた増殖の程度を表し、図16BはIL-2とIL-15を補充した培地での増殖を示す。

30

(図16C) 図16(A~C)は、実施例3に記載される可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロでポリクローナルに刺激した、CD3+セントラルメモリーT細胞(T_{CM}) (CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM})の増大動態および表現型を示す。図16Cは、これらの異なるサイトカイン環境で14日間培養した後のCD62LおよびCD127表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

(図17A) 図17(A~B)は、可溶性試薬として作用する2種類の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD8+ Tレスポnder細胞の増大の収量および表現型を示す。第1の種類のオリゴマーストレプトアビジンムテインは、実施例3で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分(従来の骨格)であり、可溶性試薬として使用される、このオリゴマーストレプトアビジンムテインの第2の種類は、本明細書では「大きな」骨格と呼ばれる上記の可溶性オリゴマーであった。これらの実験では、従来のオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分($n \geq 3$)はまた、単一のFabフラグメント(図17Aおよび図17Bでは3番目のバー)により、または α CD3 Fabフラグメントと α CD28 Fabフラグメントとの組み合わせにより機能化された試薬としても用いられた。 α CD3/ α CD28 Fabフラグメントによる組み合わせ刺激に加えて、追加の α CD8 Fabフラグメント(IBA GmbH (Goettingen, ドイツ)から市販される)も固定化されたが、それは、特定のT細胞亜集団を選択的に刺激することが可能かどうかを試験するためであった。図17Aは、6日目に採取された細胞の数に応じた増殖の程度を表す棒グラフを示し、陰性対照(非刺激の精製CD8+ Tレスポnder細胞)と比較され、陽性対照(市販の抗CD3/抗CD28ビーズ(α CD3および α CD28モノ

40

50

クローナル抗体が不可逆的に固定化されたビーズ)で刺激した精製CD8⁺ Tレスポonder細胞)に対して正規化された。

(図17B) 図17(A~B)は、可溶性試薬として作用する2種類の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD8⁺ Tレスポonder細胞の増大の収量および表現型を示す。第1の種類のオリゴマーストレプトアビジンムテインは、実施例3で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分(従来の骨格)であり、可溶性試薬として使用される、このオリゴマーストレプトアビジンムテインの第2の種類は、本明細書では「大きな」骨格と呼ばれる上記の可溶性オリゴマーであった。これらの実験では、従来のオリゴマーストレプトアビジンムテインの画分($n \geq 3$)はまた、単一のFabフラグメント(図17Aおよび図17Bでは3番目のバー)により、または α CD3 Fabフラグメントと α CD28 Fabフラグメントとの組み合わせにより機能化された試薬としても用いられた。 α CD3/ α CD28 Fabフラグメントによる組み合わせ刺激に加えて、追加の α CD8 Fabフラグメント(IBA GmbH (Goettingen, ドイツ)から市販される)も固定化されたが、それは、特定のT細胞亜集団を選択的に刺激することが可能かどうかを試験するためであった。図17Bは、細胞培養後のCD8およびT細胞表面分子CD45RO (T細胞の増殖および活性化の指標である)の表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。一元配置ANOVAを用いて種々の刺激条件を比較したところ、有意差(n.s.)は検出されなかった。

(図18A) 図18(A~B)は、単一のFabフラグメントにより、またはFabフラグメントの組み合わせ(上記の通り)により機能化された可溶性試薬として作用する可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD8⁺ Tレスポonder細胞の増大についての収量および表現型を示す。これらの実験では、CD8⁺ Tレスポonder細胞を、任意で上記の α CD8 Fabフラグメントと共に、様々な量の α CD3 Fabおよび α CD28 Fabフラグメントにより機能化された可溶性試薬(実施例3の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン(1mg/ml))で刺激した。用語「1×」とは、0.5 μ gの α CD3 Fabフラグメント単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン1.5 μ gおよび0.5 μ gの α CD28 Fab単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン1.5 μ gに相当するか、または0.5 μ gの α CD3 Fabフラグメントと0.5 μ gの α CD28 Fabを負荷したオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物3 μ l、もしくは0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD3 Fab、0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD8 Fabおよび0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD28 Fabを負荷したオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物4.5 μ lに相当する。したがって、用語「2×」は、1 μ gの α CD3 Fabフラグメント単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン3.0 μ gおよび1 μ gの α CD28 Fab単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン3.0 μ gに相当し、固定化された α CD3 Fabフラグメントの量の2倍が使用されたことを意味する。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、市販の抗CD3/抗CD28ビーズ(α CD3および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されたビーズ)で刺激した精製CD8⁺ Tレスポonder細胞を陽性対照とした。図18Aは、5日目に採取された細胞の数に応じた増殖の程度を表す棒グラフを示し、陰性対照と比較され、陽性対照に対して正規化された。

(図18B) 図18(A~B)は、単一のFabフラグメントにより、またはFabフラグメントの組み合わせ(上記の通り)により機能化された可溶性試薬として作用する可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製済みのCD8⁺ Tレスポonder細胞の増大についての収量および表現型を示す。これらの実験では、CD8⁺ Tレスポonder細胞を、任意で上記の α CD8 Fabフラグメントと共に、様々な量の α CD3 Fabおよび α CD28 Fabフラグメントにより機能化された可溶性試薬(実施例3の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン(1mg/ml))で刺激した。用語「1×」とは、0.5 μ gの α CD3 Fabフラグメント単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン1.5 μ gおよび0.5 μ gの α CD28 Fab単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン1.5 μ gに相当するか、または0.5 μ gの α CD3 Fabフラグメントと0.5 μ gの α CD28 Fabを負荷したオリゴマーストレプトアビジンムテイン

の調製物3 μ l、もしくは0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD3 Fab、0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD8 Fabおよび0.5 μ gのstrep-tag付加 α CD28 Fabを負荷したオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物4.5 μ lに相当する。したがって、用語「2 $\times$ 」は、1 μ gの α CD3 Fabフラグメント単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン3.0 μ gおよび1 μ gの α CD28 Fab単独で機能化されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン3.0 μ gに相当し、固定化された α CD3 Fabフラグメントの量の2倍が使用されたことを意味する。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、市販の抗CD3/抗CD28ビーズ (α CD3および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されたビーズ)で刺激した精製CD8+ Tレスポンダー細胞を陽性対照とした。図18Bは、細胞培養後のCD8およびCD45R0の表面発現のFACS分析を示す。

(図 19) 図19(A~B)は、可溶性試薬として用いられる実施例3の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した精製CD3+ Tレスポンダー細胞の増大を示す。1つの実験では、 α CD3/ α CD28 Fabフラグメントに加えて、IBA GmbH (Goettingen, ドイツ)から市販される α CD8 Fabフラグメント(カタログ番号6-8000-203)もストレプトアビジンムテインの可溶性オリゴマー上に固定化されたが、それは、 α CD8 Fabフラグメントをも可逆的に固定化してある試薬を用いて、バルクCD3+培養物内のCD8+ T細胞亜集団をインビトロで選択的に刺激することが可能かどうかを試験するためであった。より詳細には、0.5 μ gの α CD3 Fabと0.5 μ gの α CD28 Fabとの組み合わせを負荷したオリゴマーストレプトアビジンムテイン(1mg/ml)の調製物3 μ lで500,000個の精製CD3+レスポンダーT細胞(Tresp)を刺激した。代替的アプローチとして、4.5 μ lのオリゴマーストレプトアビジンムテインに上記の0.5 μ gの α CD3 Fab、0.5 μ gの α CD8 Fabおよび0.5 μ gの α CD28 Fabを負荷した。非刺激Tresp細胞を陰性対照とし、抗CD3/抗CD28ビーズ (α CD3および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されたビーズ)で刺激したTrespを陽性対照として用いた。図19Aは、各条件における培養物中の細胞数(増大の程度)のグラフを示す。図19Bは、各刺激条件におけるCD4+細胞とCD8+細胞の割合を示す。

(図 20 A) 図20(A~B)は、 α CD3抗体OKT3で標識した、またはStrep-tactin(登録商標)により多量体化されたOKT3のFabフラグメント(本明細書ではFab多量体とも呼ばれる)で標識した、Jurkat細胞における示差的細胞内カルシウム動員の結果を示す。図20Aの実験では、Jurkat細胞にカルシウム感受性色素Indo-1-AMを負荷し、 α CD3 mAb OKT3 (黒四角)の注入、または事前のD-ビオチンによる妨害ありもしくは妨害なし(それぞれ、濃い灰色の三角および明るい灰色の円)の α CD3 OKT3 Fab多量体(親細胞株OKT3由来)の注入によってカルシウム放出を引き起こし、PBSの注入(逆白三角)と比較した。イオノマイシンの適用を陽性対照として用いた。細胞内Ca²⁺濃度の時間分解変化を、FL6/FL7比率の変化に基づいてフローサイトメトリーによってモニターした。

(図 20 B) 図20(A~B)は、 α CD3抗体OKT3で標識した、またはStrep-tactin(登録商標)により多量体化されたOKT3のFabフラグメント(本明細書ではFab多量体とも呼ばれる)で標識した、Jurkat細胞における示差的細胞内カルシウム動員の結果を示す。図20Bの実験では、Indo-1-AMで標識したJurkat細胞を、実施例11に記載されるように、異なる α CD3刺激により活性化し(OKT3: 上のグラフ、 α CD3 Fab多量体: 中央のグラフ)、続いて α CD3 Fab多量体シグナル伝達のその後(t=140s)のD-ビオチン媒介性妨害を行った。D-ビオチンで事前解離させた α CD3 Fab多量体(下のグラフ)およびイオノマイシンを、陰性対照または陽性対照として用いた。データは3つの異なる実験を代表する。

(図 21) 図21は、抗CD3 OKT3 Fab多量体による細胞の可逆的染色の結果を示す。新鮮分離したPBMCを、モノクローナル抗体(左のドットプロット、Fab多量体の親クローン)またはコグネイトPE標識Fab多量体のいずれかで染色し、D-ビオチンによる処理前(左から2番目のドットプロット)または処理後(中央のドットプロット)に分析した。その後、残存するFab単量体を、新鮮なPE標識Strep-Tactin(登録商標)を用いて後続の洗浄工程後に検出した(右から2番目のドットプロット)。可逆的に染色した細胞の二次Fab多量体染色を対照として用いた(右のドットプロット)。生存(PI陰性)細胞のみが示される。ドットプロット内の数字は、ゲート内の細胞のパーセンテージを示す。

(図22) 図22は、蛍光標識としてフィコエリトリンで標識したStrep-Tactin(登録商標)により多量体化された抗CD28 Fabフラグメントの可逆的結合による細胞の分離を示す。CD28+細胞は、国際特許出願公開WO2013/011011に記載されるように、新鮮分離したPMBCからFab多量体磁気細胞選別によって選別/分離された。選別前に、細胞を、コグネイト蛍光aCD28多量体(左のドットプロット)で、または免疫グロブリンκ軽鎖に対する抗体(左から2番目のドットプロット、αIgκmAb)で対照染色した。選別後、細胞をD-ビオチンで処理し、次いで洗浄して磁性ビーズとFab単量体を除去した。続いて、潜在的に残っているFab単量体を検出するために、遊離したCD28+細胞を、αCD28 Fab多量体(右から2番目のドットプロット)で、またはαIgκmAb(右のドットプロット)で(再)染色した。生存(PI陰性)CD3+細胞のみが示される。ドットプロット内の数字は、ゲート内の細胞のパーセンテージを示す。

10

(図23) 図23(A~C)は、実施例3に記載される可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)に可逆的に固定化されたαCD3/αCD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した精製済みのCD4+およびCD8+ Tレスポンダー細胞の活性化後のT細胞の早期クラスター形成を示す。図23AはCD4+ T細胞の結果を示し、図23BはCD8+ T細胞の結果を示す。可溶性の多量体形成試薬(オリゴマーストレプトアビジンムテイン)で刺激したTresp、市販の抗CD3/抗CD28ビーズで刺激したTresp(陽性対照)、および非刺激T細胞(陰性対照)のデータが示される。

(図24) 図24(A~F)は、ペプチド:MHC分子複合体(細胞への一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質として作用する)およびαCD28 Fabフラグメント(細胞の表面上のアクセサリ分子に結合する第2の作用物質として作用する)の両方を用いてインビトロで刺激した精製CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM}レスポンダー細胞のバルク集団からの選択的抗原特異的(Ag特異的)増大の動態を示す；非刺激T細胞(陰性対照)が示される。抗原特異的ペプチドとMHC分子との複合体およびαCD28 Fabフラグメントの両方を、実施例3に記載したのと同じ可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン($n \geq 3$)に可逆的に固定化した。図24Aで抗原特異的増大に使用したペプチドは、サイトメガロウイルス(CMV)に特異的であるHLA-C7/IE-1エピトープを表す、HLA-C702 MHC分子によって制限された前初期1タンパク質のアミノ酸309~317のペプチド：

20

CRVLCCYVL (SEQ ID NO: 38)

であった(Ameres et al, PLOS Pathogens, May 2013, vol. 9, issue 5, e1003383に記載される)。該ペプチドを提示するMHC I分子は、その重鎖のC末端に、IBA GmbH (Goettingen, ドイツ)から「Twin-Strep-tag (登録商標)」として市販されているストレプトアビジン結合ペプチド：

30

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

を保有する。図24Aは、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された細胞に一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質として、このHLA-C7/IE-1エピトープに特異的なペプチド:MHC-I複合体を用いて増殖させた、Ag特異的細胞の画分についての例示的なフローサイトメトリ分析を示す。図24B~図24Eのグラフは、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に固定化された細胞に一次活性化シグナルを提供する第一の作用物質として、抗原特異的ペプチドとMHC I分子との異なる複合体を用いて、図24Aと同様に時点ごとに採取された、特異的ペプチド:MHC I多量体陽性細胞の数に応じたさらなるAg特異性の増大動態を示す。より詳細には、図24Bは、CMVのpp65エピトープ(HLA-A2402によって制限されたアミノ酸341~350：

40

(QYDPVAALF)(SEQ ID NO: 39)

)に特異的なペプチド:MHC-I複合体を用いて増大させたAg特異的細胞の増大を示す；図24Cは、CMVのpp65エピトープ(HLA-B702によって制限されたアミノ酸265~274：

(RPHERNGFTV)(SEQ ID NO: 40)

)に特異的な別のペプチド:MHC-I複合体を用いて増殖させたAg特異的細胞の増大を示す；図24Dは、アデノウイルスのヘキソン(hexon)5エピトープ(HLA-B702によって制限されたアミノ酸114~124：

50

(CPYSGTAYNSL)(SEQ ID NO: 41)

)に特異的なペプチド：MHC-I複合体を用いて増殖させたAg特異的細胞の増大を示す；図24Eは、CMVのHLA-B7/IE-1309～317エピトープ（

(CRVLCCYVL (SEQ ID NO: 38)

)に特異的なペプチド：MHC-I複合体を用いて増殖させたAg特異的細胞の増大を示す(例示的なFACSデータ、上記図24A参照)。Twin Strep(登録商標)-Tagを有するすべてのペプチド：MHC分子は、IBA GmbHから市販されている。これに関連して、C末端に「Twin-Strep-tag (登録商標)」を有するHLA-A*2402、HLA-B*0702およびHLA-C*0702分子のアミノ酸配列は、添付の配列表にSEQ ID NO: 42、43および44として示され、一方β2ミクログロブリン(HLAコード化分子を意味するα鎖と共に、それぞれのMHC I分子を形成する)のアミノ酸配列は、添付の配列表にSEQ ID NO: 45として示される。また、図24Fは、図24DからのHLA-B7/ヘキソン5 114-124刺激/増大細胞についての14日間培養後のCD62LおよびCD127表面発現の例示的なフローサイトメトリー分析を示す。

(図25) 図25は、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに第1および第2の作用物質として可逆的に固定化された、a)抗原特異的ペプチドMHC I複合体およびb)αCD28 Fabフラグメントを用いてインビトロで刺激した、精製CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}レスポンドー細胞からの選択的Ag特異的増大の動態を示す。この目的のために、500,000個のCD3+CD62L+CD45RA-レスポンドーT_{CM}細胞(Tresp)を、ストレプトアビジン結合ペプチドを備えた0.5μgのペプチド：MHCクラスI複合体(この特定のペプチドは、HLA-B0702によって制限されたアデノウイルスのヘキソン5タンパク質のアミノ酸114～124：

(CPYSGTAYNSL, SEQ ID NO: 41)

を表す；上記参照)および0.5μgのαCD28 Fabで機能化されたStreptactin多量体形成試薬の調製物3μlを用いて、Ag特異的に刺激した。代替刺激として、Streptactin多量体形成試薬の調製物4.5μlに0.5μgのこのペプチド：MHCクラスI複合体、0.5μgのαCD8 Fabおよび0.5μgのαCD28 Fabを負荷した。比較のために、0.5μgのαCD3 Fabと0.5μgのαCD28 Fabとの組み合わせを負荷したStreptactin多量体形成試薬(1mg/ml)の調製物3μlを用いて、ポリクロナル刺激を行った。再び上記の代替刺激条件として、0.5μgのαCD3 Fab、0.5μgのαCD8 Fabおよび0.5μgのαCD28 Fabを負荷したStreptactin多量体の調製物4.5μlを使用した。未処理(非刺激)のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3/抗CD28ビーズでポリクロナル刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、48ウェルプレートで、30U/mlのIL-2および5ng/mlのIL-15を補充した細胞培養培地1ml中に播種した。細胞を、3日ごとに培地交換して37℃でインキュベートし、細胞数を7日および14日後に分析した。図25に示す写真は、アデノウイルスのHLA-B7/ヘキソン5エピトープについて例示されるAg特異的刺激の5日目のクラスター形成の程度を表す。

(図26) 図26(A～B)は、αCD19キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように改変された形質導入Jurkat細胞の、可溶性多量体形成試薬として実施例3のオリゴマーStreptactin(登録商標)を用いて刺激された、細胞内シグナル伝達カスケードの活性化を示す。CARの特異性は、典型的には、CD19などの標的/腫瘍関連抗原に特異的に結合して、それをT細胞特異的シグナル伝達にリンクさせる、モノクロナル抗体(mAb)の抗原結合領域からアセンブルされたscFv領域に由来する(Hudecek et al, Clin Cancer Res. 2013 June 15; 19(12): 3153-3164に記載される)。この実験では、Jurkat細胞に一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質として、αCD19 CARの天然リガンドを含むCD19の細胞外ドメイン(ECD)、ならびにαCD19-CAR内のIgG4スペーサーを認識するポリクロナルαIgG F(ab)2フラグメント(ロバ抗ヒトF(ab)2はJackson Immuno Research社から市販される)も使用した。可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインへの可逆的固定化は、CD19のECDのC末端に融合されたストレプトアビジン結合ペプチド：

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

によって、またはαIgGのビオチン化(Fab)2フラグメントによって提供された(ストレプトアビジンムテイン「m2」は低い親和性でビオチンに結合するので、この結合は可逆的であり、例えば、過剰の遊離ビオチンの添加によって置き換えられる)。図26Aの対照実験では

、300,000個のCD3+ Jurkatレスポンドー細胞(Jresp)を、 α CD3 Fabおよび α CD28 Fabで機能化されたオリゴマー-Streptactin (1mg/ml)の調製物の混合物の様々な量を用いて刺激した(「 $\times 1$ 」は、0.5 μ gの α CD3 Fabおよび0.5 μ gの α CD28 Fabで機能化された3 μ gの多量体化Streptactinに相当する - ポリクローナル多量体化作用物質)。図26Bの実験では、オリゴマー-Streptactinの調製物3 μ lがCD19の細胞外ドメイン(ECD) 0.5 μ g($\times 1$)もしくは1 μ g($\times 2$)で機能化された；または、オリゴマー-Streptactinの調製物3 μ lがIgG4スパーサーを認識する α IgG 0.5 μ g($\times 1$)もしくは1 μ g($\times 2$)を負荷された(これらは両方ともCAR特異的多量体化作用物質である)。抗CD3/抗CD28ビーズ(α CD3および α CD28モノクローナル抗体を不可逆的に固定化したビーズ)またはPMAおよびイオノマイシンで刺激したJrespを陽性対照として用いた。Jresp細胞を、1.5mlエッペンドルフチューブで30U/mlのIL-2を補充した細胞培養培地200 μ l中に播種した。細胞を37°Cでインキュベートし、氷上に置き、0分から20分の刺激後に溶解させた。リン酸化ERKの検出は、活性MAPKシグナル伝達を示し、ハウスキーパー β アクチンの染色は、条件および時点ごとの総タンパク質の等量のローディングを示す。

10

(図27) フローサイトメトリーによって評価した、オリゴマームテインストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した α CD3/ α CD28 Fabによる刺激後のCD3+ T細胞におけるCa²⁺-流に及ぼすD-ビオチンの添加の影響を示す。多量体化試薬を60秒の時点(矢印「E」)で培養物に添加し、培養物をそのままにした(左パネル)か、または200秒の時点(矢印「B」)でD-ビオチンの添加および400秒の時点(矢印「I」)でイオノマイシンの添加によってさらに処理した。

20

(図28A) 培養中0、3および7日目に評価した、 α CD3/ α CD28 Fabと可逆的に結合した多量体化作用物質(1日目にD-ビオチンの添加ありもしくはなし)による刺激または対照抗CD3/抗CD28ビーズによる刺激後のCD3+ T細胞の活性化から生じる細胞計数(増大の程度)を示す。非刺激細胞を陰性対照として含めた。*: $p \leq 0.05$, 対応のある両側t検定。

(図28B) 培養中3および7日目に評価した、 α CD3/ α CD28 Fabと可逆的に結合した多量体化作用物質(1日目にD-ビオチンの添加ありもしくはなし)による刺激または対照抗CD3/抗CD28ビーズによる刺激後のCD3+ T細胞の活性化から生じるアネキシンV陽性細胞(アポトーシスを示す)のパーセントを示す。非刺激細胞を陰性対照として含めた。*: $p \leq 0.05$, 対応のある両側t検定。

30

(図29) 培養中3日目(d3)および7日目(d7)にCFSE希釈を測定することによって評価した、 α CD3/ α CD28 Fabと可逆的に結合した多量体化作用物質(2日目にD-ビオチンの添加ありもしくはなし)による刺激または対照抗CD3/抗CD28ビーズによる刺激後のCD3+ T細胞の活性化から生じる細胞周期進入および増殖を示す。非刺激細胞を陰性対照として含めた。

(図30) 培養中24時間および72時間の時点でWST-1アッセイ法により評価した、 α CD3/ α CD28 Fabと可逆的に結合した多量体化作用物質(2日目にD-ビオチンの添加ありもしくはなし)による刺激または対照抗CD3/抗CD28ビーズによる刺激後のCD4-またはCD8-精製T細胞の代謝活性を示す。非刺激細胞を陰性対照として含めた。

(図31) α CD3/ α CD28 Fabと可逆的に結合した多量体化作用物質で刺激され、(1) 分裂細胞の選別後にさらに培養され、かつさらには刺激されていない(選別精製)、(2) 分裂細胞の選別後にさらに培養され、かつ多量体化作用物質で再刺激された(選別精製、再刺激)または(3) 選別なしでさらに培養され、もしくはさらに再刺激された(非選別) CD3+ T細胞の増大能を示す。全ての条件についてさらなる培養後1日目にD-ビオチンを添加した(破線)。

40

【発明を実施するための形態】

【0159】

詳細な説明

T細胞のような標的細胞の組成物を刺激する、例えば、増大する、その生存または持続性、その分化を誘導するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様に

50

において、本方法は、受容体結合分子のような、標的細胞の表面上の分子に結合し、それによって細胞に、場合によっては一次活性化シグナルでありうる、シグナルを提供することができる可逆的試薬システムに関する。いくつかの態様において、本方法は、一次活性化シグナルおよび/またはアクセサリシグナルもしくは共刺激シグナルのような、シグナルを細胞に提供する、1つまたは複数の作用物質、例えば第1の作用物質、第2の作用物質などが結合している多量体形成試薬でありうる、試薬を利用する。いくつかの態様において、一次活性化シグナルは、それ自体として、増大/増殖するように細胞を活性化するのに十分でありうる。この第1の作用物質は、多量体形成試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合することができる。多量体形成試薬は、細胞の表面上のアクセサリ分子を刺激する第2の作用物質にも結合していてもよい。第2の作用物質は、細胞表面上の表面のアクセサリ分子に結合すると、それにより活性化細胞を刺激して増大させうる。また、この第2の作用物質は、多量体形成試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合することができる。いくつかの局面において、1つまたは複数の追加の作用物質を利用して、細胞において追加のシグナルをモジュレートまたは誘導することもできる。いくつかの態様において、提供される方法は、可逆的試薬の時間制御妨害によって細胞の刺激を一時的に制御する段階を伴う。

10

【0160】

本出願において言及された、特許文書、科学文献およびデータベースを含む刊行物は全て、各個別の刊行物が参照により個別に組み入れられるのと同じ程度に、全ての目的のために参照によりその全体が組み入れられる。本明細書において記載された定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願および他の刊行物に記載された定義と相違するか、または他の点で一致しない場合、参照により本明細書に組み入れられる定義ではなく、本明細書において記載された定義が優先される。例えば、国際PCT出願番号PCT/EP2015/058339の内容は、参照によりその全体が組み入れられる。

20

【0161】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、系統立ててまとめることだけを目的とし、記述された主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【0162】

I. 可逆的試薬を用いて細胞をモジュレートまたは刺激するための方法およびシステムの概略

30

いくつかの態様において、本方法は、標的細胞を含む複数の細胞を、作用物質が可逆的に結合している1つまたは複数の多量体形成試薬と接触させる段階のような、インキュベートする段階を伴う。いくつかの態様において、多量体形成試薬は、固体支持体上に固定化されていてもまたは可溶性であってもよく、それによって細胞のインキュベーションの少なくとも一部の間に、細胞は多量体形成試薬と接触する。1つの局面において、本明細書に開示される方法は、細胞集団の連続的増大であり、その中で完全なリンパ球集団が刺激/増大され、増大に必要とされる試薬はその後、適当な固定相上でのクロマトグラフィーにより取り除かれる。いくつかの態様において、培養細胞である増大/刺激された細胞は、任意で、例えばT細胞受容体またはキメラ抗原受容体（CAR）をトランスフェクトされ、そしていくつかの局面において、導入されたT細胞受容体またはキメラ抗原受容体に結合する異なる刺激分子を用いた第2の刺激増大に供され得る。

40

【0163】

外因性成長因子の非存在下または少量の外因性成長因子の下でT細胞集団をインビトロで増大する方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許6,352,694 B1および欧州特許EP0 700 430 B1を参照のこと）。一般に、そのような方法は、様々な結合物質（例えば、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体）が固定された1 μ M超の固相表面を使用する。例えば、抗CD3/抗CD28ビーズ（Invitrogen）は、市販されているT細胞増大用試薬であり、これは、ヒトT細胞上のCD3およびCD28細胞表面分子に対する親和性精製されたモノクローナル抗体の混合物でコーティングされた、均一な、4.5 μ mの、超常磁性、滅菌性、非発熱性ポリスチレンビーズである。しかし、いくつかの例において、そのような磁気ビーズ

50

は、例えば、臨床試験または治療のために必要とされる条件下では、増大されたT細胞を患者に投与する前にこれらの磁気ビーズが完全に取り除かれたことが確実にならなければならないという理由で、細胞を増大する方法に組み込むことが困難である。

【0164】

いくつかの態様において、本明細書に提供される方法は、これらの問題に対処する。いくつかの局面において、提供される試薬が可逆的であるので、刺激物質が細胞組成物から除去され得る。また、いくつかの局面において、試薬、例えば、刺激物質が結合された多量体形成試薬は、支持体に固定化されない、例えば、固体支持体または表面に固定化されない。したがって、いくつかの局面において、試薬、例えば多量体形成試薬は、柔軟であり、硬直的でない。いくつかの態様において、試薬は、細胞表面に適応または順応し得る。いくつかの態様において、固定相を含む支持体、例えば固体支持体に、試薬を固定化することが可能である。いくつかの態様において、そのような方法は、1つまたは複数の標的細胞を選択して同時または連続的に刺激物質に曝露させることができる、類似の（複数の）選択物質を用いる選択方法と共に使用され得る。したがって、いくつかの局面において、刺激と組み合わせた選択および単離によって、特定の細胞または細胞サブセットの刺激にバイアスをかけることができる。

10

【0165】

いくつかの態様において、提供される方法は、細胞の組成物をインキュベートまたは培養する、例えば細胞の組成物を、試薬、例えば1つまたは複数の受容体結合物質（例えば、刺激物質）に結合された多量体形成試薬と、接触させる工程を含む（例えば、図3および4を参照のこと）。いくつかの態様において、細胞組成物を多量体形成試薬と接触させ、そして通常、細胞集団を多量体形成試薬と共にインキュベートした後、細胞の集団は、複合体を形成する／第1の作用物質を通じて多量体形成物質に結合する。特定の細胞表面分子を欠く出発試料中に含まれる他の細胞集団は、多量体形成試薬に結合しない。これに関して、細胞集団は通常、その表面上に細胞表面分子を複数コピー有し、典型的に、これらの複数コピーの結合が刺激または活性化に必要とされることに留意されたい。

20

【0166】

したがって、多量体形成物質は、典型的に、2つ以上の結合部位、例えばZ1を提供し、いくつかの例において、複数の作用物質がこれに可逆的に結合されて、細胞集団に対して第1の作用物質、第2の作用物質および／または他の作用物質を十分な密度で提示し得る。これに関して、多量体形成物質は、複数の結合部位、例えばZ1を有し得、例えば（ホモ四量体である）ストレプトアビジンムテインは、そのネイティブ状態で、4つのそのような結合部位、例えばZ1を有し、そしてさらにオリゴマー化され得る。いくつかの例において、試薬は、C1などの結合パートナーの可逆的結合のために、1つの結合部位、例えばZ1のみを有し得る。そのような例は、多量体カルモジュリンである。カルモジュリンは、カルモジュリン結合ペプチドに対する結合部位を1つしか有さない。しかし、カルモジュリンは、ピオチニル化されその後ストレプトアビジンオリゴマーと反応させられ得（以下も参照のこと）、それによって複数のカルモジュリン分子が「スキヤホールド」上に高密度で存在し、それによって多量体カルモジュリンを提供する多量体形成試薬を提供する。

30

【0167】

いくつかの態様において、インキュベート後にまたは刺激が中断されることが望まれる他の適当な時点において、可逆的に結合した作用物質の結合パートナーC、例えばC1と、多量体形成試薬の結合部位Z、例えばZ1との間の結合は、各々の可逆的結合を破壊することによって破壊される。いくつかの例において、破壊は、多量体形成試薬に結合した細胞の集団を含むインキュベート／反応混合物に競合物質を添加することによって達成され得る。可逆的に結合した作用物質の結合パートナーC、例えばC1と、多量体形成試薬の結合部位Z、例えばZ1との間の可逆的結合の競合的破壊（競合的溶出であると理解することもできる）の場合、インキュベート混合物／細胞集団は、遊離した第1の結合パートナーC、例えばC1と、接触させられ得る、または、第1の結合パートナーと結合部位Z、例えばZ1との間の結合を破壊することができる第1の結合パートナーCの類似体と、接触させられ得る

40

50

。ストレプトアビジンのビオチン結合部位に結合するストレプトアビジン結合ペプチドである結合パートナーC、例えばC1の例において、第1の遊離したパートナーは、対応する遊離したストレプトアビジン結合ペプチドまたは競合的に結合する類似体であり得る。そのような類似体は、例えば、ビオチンまたはビオチン誘導体、例えばデスチオビオチンであり得る。

【0168】

いくつかの態様において、遊離パートナーまたはその類似体の添加は、結合パートナーC、例えばC1を多量体形成試薬から取り除き、そして結合パートナーは可逆的に結合した作用物質に含まれるので、多量体形成試薬からのそのような作用物質の除去が達成される。この作用物質の除去は、次いで、特に第1の作用物質と細胞表面受容体との間の結合の結合親和性が 10^{-2} M $\sim 10^{-13}$ Mの範囲の解離定数 (K_D) を有し、かつ可逆的でもある場合に、第1の作用物質を細胞表面分子から解離させる。いくつかの局面においては、この解離によって、細胞集団の刺激も終了する。

10

【0169】

いくつかの態様において、例えば、細胞表面受容体分子を含むそれらの抗原に対する抗体分子の結合親和性は、通常、 K_D 約 10^{-7} M $\sim$ 約 10^{-13} Mの親和性範囲である。したがって、従来のモノクローナル抗体が、作用物質（第1または第2の、受容体結合物質、例えば刺激物質または選択物質）として使用され得る。いくつかの態様において、より強い結合をもたらす望まれないアビディティ効果を避けるために、モノクローナル抗体はまた、それらの一価抗体フラグメント、例えばFabフラグメントまたは単鎖Fvフラグメントの形態でも使用され得る。

20

【0170】

提供される方法は、細胞集団の刺激または増大の期間を正確に制御でき、かつ細胞集団の機能的状況も精密に制御できるという利点を有する。本明細書に記載されるように、物質、例えば競合物質（例えば、ビオチンまたは類似体）を刺激後5日以内に添加することによる、細胞、例えばT細胞、の短時間活性化は、細胞を増殖させるまたは刺激するが、細胞の1つまたは複数の特徴（characteristic）または特徴（feature）、例えば、CD4またはCD8 T細胞パーセンテージ、CD8/CD4比率、表現型マーカーおよび／または分化状況を変化させる。例えば、本明細書に記載された結果により、提供される試薬の態様を用いてシグナルを一時的に制御する能力は、低分化、長寿命のT細胞集団、例えば長寿命メモリーT細胞を増加させることが示されている。いくつかの例において、例えば競合物質を用いた多量体化作用物質の結合の破壊によるシグナルの一時的制御は、他と比較した特定のサブ集団の相対的増大および／または維持（例えば、CD4+対CD8+）を調整または調節するために使用され得る。

30

【0171】

いくつかの態様において、可逆的に結合した作用物質または作用物質群を細胞表面分子から解離することにより、提供される方法は、刺激された細胞集団が刺激期間の終了時点で刺激物質を含まないというさらなる利点を有する。また、いくつかの態様において、この方法で使用されるすべての他の試薬、すなわち作用物質（例えば、第1または第2の、受容体結合物質、例えば刺激物質または選択物質）、およびC1などの結合パートナーCの競合試薬、またはその類似体は、（例えば、国際特許出願公開WO 2013/124474に記載される）「除去カートリッジ」を通じて、刺激された細胞集団から容易に除去され得る。例えば固体支持体、例えばバイオリアクター表面または磁気ビーズに多量体形成試薬が固定化されるいくつかの例においては、それは使用されない。したがって、遊離した作用物質および競合試薬の除去のための除去カートリッジの使用は、溶出試料（例えば、可逆的結合の破壊後に得られる試料）を第2のクロマトグラフィーカラムに投入することを含み得る。

40

【0172】

いくつかの態様において、このクロマトグラフィーカラムは、親和性クロマトグラフィーマトリクスであり同時にゲル透過マトリクスとしても機能し得る適当な固定相を有する。いくつかの局面において、この親和性クロマトグラフィーマトリクスには、親和性試薬

50

が固定化される。いくつかの態様において、親和性試薬は、例えば、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテインまたはそれらの混合物であり得る。いくつかの態様において、作用物質（例えば、第1または第2の、受容体結合物質、例えば刺激物質または選択物質）、結合パートナーC、C1の競合試薬は、親和性試薬に結合し、それによってクロマトグラフィーマトリクス上に固定化される。その結果、単離され増大された細胞集団を含む溶出試料は、作用物質（例えば、第1または第2の、受容体結合物質、例えば刺激物質または選択物質）および競合試薬を含まない。いくつかの態様において、培養された組成物は、いかなる反応物質も含まず、これはいくつかの局面において、診断用途（例えば、さらなるFACS（商標）選別）に関連してまたは任意の細胞ベースの治療用途で使用する上で、有利である。

10

【0173】

いくつかの態様において、組成物から試薬および他の成分を除去する能力は、任意の固体支持体、例えば磁気ビーズを回避することができるというさらなる利点を有する。いくつかの態様において、これは、活性化T細胞にそのような磁気ビーズが混入する危険がないかまたは最小限であることを意味する。いくつかの態様において、これはまた、他の方法、例えば最終的な増大されたT細胞集団が磁気ビーズを含まないことを確実にするためにさらなる手段が採用されなければならないDynabeadsの使用と比較してGMP標準に適合するプロセスをより容易に構築することができることを意味する。さらに、いくつかの態様において、可溶性多量体形成物質の使用は、細胞を遠心分離により簡単に沈降させることができ、そして可溶性多量体形成物質を含むその上清を廃棄することができるので、活性化細胞集団（T細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞）からそれを除去することをより簡単にする。あるいは、可溶性多量体形成物質は、例えば上記（例えば、国際特許出願公開WO 2013/124474）のような、除去カートリッジのゲル透過マトリクスにおいて、増大された細胞集団から除去され得る。いくつかの態様において、固相（例えば、磁気ビーズ）が存在しないため、本発明は、公知の細胞増大システム、例えばGE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom)から入手可能なXuri Cell Expansion System W25およびWAVE Bioreactor 2/10 SystemまたはTerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA)から入手可能なQuantum（登録商標）Cell Expansion Systemに組み込むことができる、細胞増大のための自動化された閉鎖システムも、提供する。

20

【0174】

いくつかの局面において、本明細書に提供される方法は、少なくとも2つの特定の細胞表面分子を有する細胞集団を含み得る。いくつかの態様において、第1の細胞表面分子は、細胞集団に対する一次活性化シグナルに関与し、第2の細胞表面分子は、細胞に対する刺激の提供に関与する細胞表面上のアクセサリー分子である。いくつかの態様において、細胞集団は、細胞に対して一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質と、追加のシグナルを誘導または調整する、例えば細胞表面上のアクセサリー分子を刺激する第2の作用物質とに可逆的に結合された多量体形成試薬に、接触させられる。細胞の集団は、例えば、細胞表面分子がTCR/CD3複合体であり、細胞表面分子がアクセサリー分子CD28であるT細胞集団であり得る。さらに、本明細書に記載されるように、他のアクセサリー分子、例えばCD90（Thy-1）、CD95（Apo-/Fas）、CD137（4-1BB）、CD154（CD40L）、ICOS、LAT、CD 27、OX40およびHVEMの1つまたは複数を標的とすることもまた想定されている。いくつかの局面において、そのような他のアクセサリー分子を通じた刺激は、CD28を通じた従来の刺激と比較して、低分化の、かついくつかの例においては、長寿命集団のT細胞、例えば長寿命メモリーT細胞を増加させる。いくつかの態様において、一次活性化シグナルとしてのTCR/CD3複合体の結合およびアクセサリー分子（例えば、CD28または他のアクセサリー分子）の結合の両方とも、T細胞の増大／増殖に必要とされ得る。

30

40

【0175】

記述のようにいくつかの態様において、細胞の集団は、あるいはまたはさらに、細胞の表面上の分子を標的とするまたは結合する作用物質に可逆的に結合する多量体化試薬の存在下において刺激されて、細胞の生存、増殖および/または1つもしくは複数の他の特性を

50

モジュレートする追加のシグナルを提供しうる。そのような標的とされる分子は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体または接着分子を含むが、これらに限定されることはない。いくつかの局面において、そのような追加の分子を通じた刺激は、例えば、持続性、生存の増加および/または枯渇の少ない表現型もしくは活性を含む、刺激または培養された細胞の1つまたは他の改善された特徴をもたらすことができる。

【0176】

いくつかの態様において、また、本明細書において提供される方法は、受容体結合物質、例えば第1もしくは第2および/または追加の受容体結合物質(例えば、刺激物質)のいずれかまたは両方と、同じ試薬、例えば同じ多量体化試薬に可逆的に結合する少なくとも1つの選択物質を含むようにさらに組み合わせることができる。場合によっては、1つまたは複数の刺激物質の存在下において同様に行われるインキュベーションまたは培養において少なくとも1つまたは複数の選択物質の存在下において可逆的に選択されうるT細胞のサブセットにおいて、増大(増殖)の刺激、活性化、共刺激、および/または生存のような、インキュベーションまたは培養から生じる1つまたは複数の特徴を増強または増加させることが可能である。例えば、本明細書における実施例に示されるように、T細胞の組成物における増大の程度はCD8+細胞において、そのような細胞を抗CD3抗体および抗CD8抗体刺激物質に加えて抗CD8抗体に可逆的に結合した多量体化作用物質とともにインキュベートした場合に、選択的に増加した。いくつかの態様において、増大(増殖)の刺激、活性化、共刺激、および/または生存のような、インキュベーションまたは培養から生じる1つまたは複数の特徴は、選択物質ではなく1つまたは複数の(one of more)刺激物質におけるのみのインキュベーションと比較して1つまたは複数の刺激物質および選択マーカーに特異的に結合する選択物質の存在下においてインキュベートされた場合に、選択マーカーが陽性である培養組成物中のT細胞のサブセットにおいて少なくとも1.5倍、少なくとも2.0倍、少なくとも3.0倍、少なくとも4.0倍、少なくとも5.0倍、少なくとも6.0倍、少なくとも7.0倍、少なくとも8.0倍、少なくとも9.0倍、少なくとも10.0倍またはそれ以上、増加することができる。T細胞のような、細胞のこのバイアスまたは選択性は、T細胞の特定のサブセットまたは集団のエンドポイントの特徴を制御することを可能にする。いくつかの態様において、選択マーカーは、本明細書において記述される任意の選択マーカーであることができる。いくつかの態様において、選択マーカーはCD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA、および/またはCD45ROの中から選択される。

【0177】

いくつかの態様において、多量体形成試薬は、作用物質、例えば第1の作用物質の可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Z、例えばZ1を含み、作用物質、例えば第1の作用物質はまた、少なくとも1つの結合パートナーC、例えばC1を含み、結合パートナーC、例えばC1は、多量体形成試薬の結合部位Z、例えばZ1に、可逆的に結合することができる。したがって、作用物質、例えば第1の作用物質は、多量体形成物質と接触するまたは多量体形成物質と共にインキュベートされると、結合パートナーC、例えばC1と結合部位Z、例えばZ1との間で形成される可逆的結合を通じて多量体形成試薬に可逆的に結合され得る。加えて、1つまたは複数のさらなる作用物質、例えば第2の作用物質は、結合パートナーC、例えばC2を含み得、結合パートナーC2は、多量体形成試薬の結合部位Z、例えばZ2に、可逆的に結合することができる。いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる作用物質、例えば第2の作用物質は、多量体形成物質と接触するまたは多量体形成物質と共にインキュベートされると、結合パートナーC、例えばC1と結合部位Z、例えばZ2との間で形成される可逆的結合を通じて多量体形成試薬に可逆的に結合される。いくつかの例において、C1およびC2は、同じもしくは実質的に同じであり得、および/または同じもしくは実質的に同じ部分を含み得る。いくつかの例において、Z1およびZ2は、同じもしくは実質的に同じであり得、および/または同じもしくは実質的に同じ部分を含み得る。

【0178】

いくつかの態様において、結合パートナーC1およびC2として使用される場合、多量体形成物質の同じ結合部位に結合する部分は、標的細胞(例えば、T細胞)の集団の増大を妨

げ、いくつかの例においては停止させるために、および多量体形成物質からこの標的細胞（例えば、T細胞）の集団を解放するために、同じ競合試薬（第1の結合パートナーC1の競合試薬であり、第2の結合パートナーC2の競合試薬でもある）またはその類似体を使用することができるという利点を有する。

【0179】

結合パートナーCを含む結合物質（例えば、第1の、第2の、および/またはさらなる受容体結合物質、例えば刺激物質または選択物質）を作製するいくつかの例において、結合パートナーC、例えばC1またはC2は、作用物質（例えば、抗体フラグメント）の組換え生産のために使用されるそれぞれの発現ベクターによって提供され得るので、結合パートナーC、例えばC1またはC2は、そのN末端またはC末端のいずれかにおいてその作用物質を含む融合ペプチドの一部である。いくつかの態様において、抗体または抗原結合フラグメントである作用物質の場合、結合パートナーC、例えばC1またはC2は、その軽鎖または重鎖のいずれかのC末端に存在し得る。組換えタンパク質、例えば抗体分子、の可変ドメインをクローニングし、それぞれのタンパク質、例えば抗体フラグメント、を組換え生産する方法はまた、当業者に公知であり、例えばSkerra, A. (1994)を参照されたい。いくつかの態様において、抗体分子は、例えば、周知の進化的方法、例えばファージディスプレイ（例えば、Kay, B.K. et al. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424またはRodi, D.J., and Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93によって概説されている）、リボソームディスプレイ（Amstutz, P. et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405において概説されている）またはWilson, D.S. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755で報告されているmRNAディスプレイによって、特定の標的、例えば記載されるようなCD3もしくはCD28または他のアクセサリもしくは刺激分子に対する抗体様特性を有する人工結合分子として生成され得る。

【0180】

II. 可逆的試薬システムおよび関連する使用

いくつかの態様において、本方法は、細胞の表面上の分子（細胞表面分子）に結合することができる少なくとも1つの作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）が試薬に可逆的に結合されている可逆的システムを使用する。いくつかの例において、試薬は、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む。いくつかの例において、試薬は、多量体形成試薬である。いくつかの態様において、少なくとも1つの作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、その分子のエピトープまたは領域に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位Bを含み、かつ試薬の少なくとも1つの結合部位Zに特異的に結合する結合パートナーCも含む。いくつかの例において、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用は、非共有結合的相互作用である。いくつかの態様において、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用、例えば非共有結合的相互作用は、可逆的である。

【0181】

いくつかの態様において、可逆的結合は、これもまた少なくとも1つの結合部位Zに結合することができる結合部位であるかまたはそのような結合部位を含む物質、例えば競合試薬（溶出試薬とも称される）、の存在下で行われ得る。通常、この物質（例えば、競合試薬）は、試薬中に存在する結合部位Zに対する高い結合親和性によりおよび/または結合パートナーCよりも高い濃度で存在することにより、競合物質として作用し、それによって試薬から結合パートナーCを分離および/または解離させることができる。いくつかの態様において、少なくとも1つの結合部位Zに対する物質（例えば、競合試薬）の親和性は、少なくとも1つの結合部位Zに対する作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の結合パートナーCの親和性よりも高い。したがって、いくつかの例において、試薬の結合部位Zと作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の結合パートナーCとの

間の結合は、物質（例えば、競合試薬）の添加によって妨げられ、それによって作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）と試薬との結合が可逆的にされ得る。

【0182】

そのような可逆的システムにおいて使用され得る試薬は、報告されており、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,168,049号；同第5,506,121号；同第6,103,493号；同第7,776,562号；同第7,981,632号；同第8,298,782号；同第8,735,540号；同第9,023,604号；ならびに国際公開PCT出願番号WO2013/124474およびWO2014/076277を参照されたい。可逆的相互作用を形成することができる試薬および結合パートナーならびにそのような結合を逆転することができる物質（例えば、競合試薬）の非限定的な例は、以下に記載されている。

10

【0183】

A. 試薬

いくつかの態様において、試薬は、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合することができる1つまたは複数の結合部位Zを含む。いくつかの態様において、試薬は、試薬が複数の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に可逆的に結合することができる、例えば多量体形成試薬であるよう、各々が作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCに特異的に結合することができる複数の結合部位Zを含む。いくつかの態様において、試薬は、個別分子（例えば、単量体）のオリゴマーもしくはポリマー、または各々が少なくとも1つの結合部位Zを含む個別分子を形成する複合体（例えば、四量体）である。いくつかの態様において、試薬は、少なくとも2つの結合部位Z、少なくとも3つの結合部位Z、少なくとも4つの結合部位Z、例えば、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72個またはそれ以上の結合部位Zを含む。結合部位はすべて同じであり得るか、または複数の結合部位は1つもしくは複数の異なる結合部位（例えば、Z1、Z2、Z3等）を含み得る。

20

【0184】

いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、例えば試薬上に存在する1つまたは複数の結合部位Zを通じて、試薬に結合する、例えば可逆的に結合する。いくつかの例において、これにより、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）が相互に対して近接して配置され、（少なくとも2コピーの）細胞表面分子を有する標的細胞が特定の分子に結合することができる1つまたは複数の結合部位Bを有する作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）と接触した際にアビディティ効果が発生し得る。

30

【0185】

いくつかの態様において、同じである、すなわち同じ結合部位Bを含む、2つまたはそれ以上の異なる作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）が、試薬に可逆的に結合され得る。いくつかの態様において、少なくとも2つの異なる（種類の）作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）を使用することが可能であり、いくつかの例においては、3つまたは4つの異なる（種類の）作用物質、例えば2つまたはそれ以上の異なる受容体結合物質および／または選択物質を使用することが可能である。例えば、いくつかの態様において、試薬は、結合部位B1、B2、B3またはB4等を含む第1の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）および別の結合部位、例えば結合部位B1、B2、B3またはB4とは別のものを含む第2の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に可逆的に結合され得る。いくつかの例において、第1の作用物質および第2の作用物質の結合部位は、同じであり得る。例えば、いくつかの局面において、少なくとも2つの作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の各々が、同じ分子に結合し得る。いくつかの例において、第1の作用物質と第2の作用物質の結合部位は、異なり得る。いくつかの局面において、少なくとも2つの作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の各々は、異なる分子、例えば第1の分子、第2の分子等に結合し得る。いくつかの例において、異なる分子、例えば細胞表面分子は、同じ標的細胞上に存在し得る。他の例において、

40

50

異なる分子、例えば細胞表面分子は、同じ細胞集団内に存在する異なる標的細胞上に存在し得る。いくつかの例において、各々がさらなる異なる結合部位を含む第3、第4等の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）が、同じ試薬に結合され得る。

【0186】

いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の異なる作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、同じ結合パートナーCを含む。いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の異なる作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、異なる結合パートナーを含む。いくつかの局面において、第1の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、試薬上に存在する結合部位Z1に特異的に結合し得る結合パートナーC1を有し得、第2の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、試薬上に存在する結合部位Z1または結合部位Z2に特異的に結合し得る結合パートナーC2を有し得る。したがって、いくつかの例において、試薬に含まれる複数の結合部位Zは、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーC1およびC2に可逆的に結合することができる、それぞれ、結合部位Z1およびZ2を含む。いくつかの態様において、C1およびC2は同じであり、ならびに／またはZ1およびZ2は同じである。他の局面において、複数の結合部位Zの1つまたは複数は、異なり得る。他の例において、複数の結合パートナーCの1つまたは複数は、異なり得る。結合パートナーCの各々が結合部位Zの1つと相互作用する、例えば特異的に結合することができる限り、結合部位Zを含む試薬と適合する任意の異なる結合パートナーCの組み合わせを選択することは、当業者の技能の範囲内である。

【0187】

いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインもしくは類似体、アビジン、アビジンムテインもしくは類似体（例えば、ニュートラアビジン）またはそれらの混合物であり、そのような試薬は、結合パートナーCとの可逆的結合のための1つまたは複数の結合部位Zを含む。いくつかの態様において、結合パートナーCは、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインもしくは類似体、アビジンまたはアビジンムテインもしくは類似体に特異的に結合することができるビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体、またはストレプトアビジン結合ペプチドもしくは他の分子であり得る。いくつかの態様において、試薬は、ビオチン、ビオチン類似体もしくはそれらの生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン、または類似体もしくはムテインもしくはアビジンであるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンの類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテインであるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、物質（例えば、競合試薬）は、結合パートナーCと、1つまたは複数の結合部位Zに対する結合について競合することができるビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドであり得る。いくつかの態様において、結合パートナーCおよび物質（例えば、競合試薬）は異なり、物質（例えば、競合試薬）は結合パートナーの親和性と比較して1つまたは複数の結合部位Zに対してより高い結合親和性を示す。

【0188】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、野生型ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインまたは類似体、例えばストレプトアビジン様ポリペプチドであり得る。同様に、アビジンは、いくつかの局面において、野生型アビジンまたはアビジンのムテインもしくは類似体、例えば、典型的により中性のpIを示し、ネイティブアビジンの代替物として利用可能である修飾アルギニンを有する脱グリコシル化アビジンであるニュートラアビジンを含む。通常、脱グリコシル化された中性形態のアビジンは、市販されている形態、例えばSigma Aldrichから入手可能な「Extravidin」またはThermo ScientificもしくはInvitrogenから入手可能な「NeutrAvidin」を含む。

【0189】

いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテ

10

20

30

40

50

インもしくは類似体である。いくつかの態様において、野生型ストレプトアビジン (wt-ストレプトアビジン) は、Argarana et al, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882に開示されるアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) を有する。一般に、ストレプトアビジンは、自然状態で、各サブユニットがビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはビオチン模倣体に対する単一の結合部位を含む4つの同一のサブユニットの四量体として存在する、すなわち、ホモ四量体である。ストレプトアビジンサブユニットの例示的な配列は、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列であるが、そのような配列はまた、他のストレプトマイセス種由来のそのホモログに存在する配列も含み得る。特に、ストレプトアビジンの各サブユニットは、約 10^{-14} Mのオーダーの平衡解離定数 (K_D) のビオチンに対する強い結合親和性を示し得る。いくつかの例において、ストレプトアビジンは、4つの結合部位のうち1つのみが機能的である一価四量体 (Howarth et al. (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63))、4つの結合部位のうち2つが機能的である二価四量体 (Fairhead et al. (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214) として存在し得、または単量体もしくは二量体形態で存在し得る (Wu et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31; Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91)。

【0190】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、任意の形態、例えば、野生型または非修飾ストレプトアビジン、例えば、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体もしくはビオチン模倣体に対する結合部位を含む少なくとも1つの機能的サブユニットを含む、例えば通常SEQ ID NO:1に示されるストレプトマイセス・アビジニイ (*Streptomyces avidinii*) 由来の野生型ストレプトアビジンの少なくとも1つの機能的サブユニットもしくはその機能的に活性なフラグメントを含むストレプトマイセス種由来のストレプトアビジンもしくはその機能的に活性なフラグメントであり得る。例えば、いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、Nおよび／またはC末端で短縮された野生型ストレプトアビジンのフラグメントを含み得る。そのような最小ストレプトアビジンは、N末端においてSEQ ID NO:1のアミノ酸位置10~16の領域で始まり、C末端においてSEQ ID NO:1のアミノ酸位置133~142の領域で終了する任意のものを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンの機能的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジン、例えばSEQ ID NO:2に示されるものはさらに、SEQ ID NO:1に示される番号でいうAla13に対応する位置にN末端メチオニンを含み得る。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインにおける残基の位置の参照は、SEQ ID NO:1における残基の番号を参照する。

【0191】

いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失または付加によって非修飾または野生型ストレプトアビジンの配列から区別されるが、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を含む少なくとも1つの機能的サブユニットを含むポリペプチドを含む。いくつかの局面において、ストレプトアビジン様ポリペプチドおよびストレプトアビジンムテインは、本質的に野生型ストレプトアビジンと免疫学的に等価であり、特にwt-ストレプトアビジンと同じまたは異なる親和性でビオチン、ビオチン誘導体またはビオチン類似体に結合することができるポリペプチドであり得る。いくつかの例において、ストレプトアビジン様ポリペプチドまたはストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含み得るまたはそれらは野生型ストレプトアビジンの一部のみを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジン様ポリペプチドは、宿主により産生されたポリペプチドを野生型ストレプトアビジンの構造に変換するために必要とされる酵素を宿主が有さないために、野生型ストレプトアビジンと同一でないポリペプチドである。いくつかの態様において、ストレプトアビジンはまた、ストレプトアビジン四量体およびストレプトアビジン二量体、特にストレプトアビジンホモ四量体、ストレプトアビジンホモ二量体、ストレプトアビジンヘテロ四量体およびストレプトアビジン

ヘテロ二量体として存在し得る。一般に、各サブユニットは通常、ビオチンもしくはビオチン類似体に対するまたはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を有する。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの例は、例えば、WO 86/02077、D E 19641876 A1、US 6,022,951、WO 98/40396またはWO 96/24606において言及されている。

【0192】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、非修飾もしくは野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含み得るまたは野生型もしくは非修飾ストレプトアビジンの一部のみを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、非修飾または野生型ストレプトアビジンのサブユニットとの比較で、例えばSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンサブユニットまたは例えばSEQ ID NO:2に示される、その機能的に活性なフラグメントとの比較で1つまたは複数のアミノ酸置換（substitutions）（置換（replacements））を有し得る少なくとも1つのサブユニットを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインの少なくとも1つのサブユニットは、野生型もしくは非修飾ストレプトアビジンと比較して少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個のアミノ酸の相違を有し得、および／またはSEQ ID NO:1もしくは2に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む少なくとも1つのサブユニットを含む、そのようなストレプトアビジンムテインは、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはビオチン模倣体に結合する機能的活性を示す。いくつかの態様において、アミノ酸の置換（replacements）（置換（substitutions））は、保存的または非保存的変異である。ストレプトアビジンムテインの例は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第5,168,049号；同第5,506,121号；同第6,022,951号；同第6,156,493号；同第6,165,750号；同第6,103,493号；もしくは同第6,368,813号；または国際公開PCT出願番号W02014/076277を参照されたい。

【0193】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する1つまたは複数の結合部位Zを含む1または2つ以上の機能的サブユニット、例えば、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上およびいくつかの例においては、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上の機能的サブユニットを含むタンパク質を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、単量体；ヘテロ二量体もしくはホモ二量体を含む、二量体；ホモ四量体、ヘテロ四量体、一価四量体もしくは二価四量体を含む四量体を含み得、またはそれらのより高次の多量体もしくはオリゴマーを含み得る。

【0194】

いくつかの態様において、ペプチドリガンド結合パートナーに対するストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの結合親和性は、 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} Mまたは 1×10^{-7} M未満であるが、通常 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} Mまたは 1×10^{-11} Mより大きい。例えば、例えば米国特許第5,506,121号に開示されるものなどのペプチド配列（Strep-tag）は、ビオチン模倣体として機能し、例えばおよそ 10^{-4} Mから 10^{-5} Mの間の K_D の、ストレプトアビジンに対する結合親和性を示し得る。いくつかの例において、結合親和性は、ストレプトアビジン分子内に変異を導入することによってさらに改善され得、例えば米国特許第6,103,493号または国際公開PCT出願番号W02014/076277を参照されたい。いくつかの態様において、結合親和性は、当技術分野で公知の方法、例えば以下に記載されるいずれかによって決定され得る。

【0195】

いくつかの態様において、試薬、例えばストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、ペプチドリガンド結合パートナーに対する結合親和性を示し、このペプチド

リガンド結合パートナーは、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）中に存在する結合パートナーCであり得る。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:9に示される一般式を有する配列を含む、例えば、SEQ ID NO:10に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。1つの例において、ペプチド配列は、Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly（Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。1つの例において、ペプチド配列は、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（Strep-tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）である。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、少なくとも2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続的配置を含み、2つのモジュール間の距離は少なくとも0でありかつ50アミノ酸以下であり、1つの結合モジュールは、3～8アミノ酸を有し、少なくとも配列His-Pro-Xaa（SEQ ID NO:9）を含み、Xaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンであり、他の結合分子は、例えばSEQ ID NO:11に示される、同じまたは異なるストレプトアビジンペプチドリガンドを有する（例えば、国際公開PCT番号W002/077018；米国特許第7,981,632号を参照のこと）。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、SEQ ID NO:13または14のいずれかに示される式を有する配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、SEQ ID NO:15～19のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する。

【0196】

いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジンムテインであるまたはストレプトアビジンムテインを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性な部分との比較で1つまたは複数の変異（例えば、アミノ酸の置換）を含む。例えば、ストレプトアビジンの生物学的に活性な部分は、いくつかの例において最小ストレプトアビジンと呼ばれる、Nおよび／またはC末端で短縮されたストレプトアビジンバリエーションを含み得る。いくつかの態様において、任意の変異が導入され得るN末端短縮最小ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:1に示される配列との比較で、N末端がアミノ酸位置10～16の領域から始まり、C末端がアミノ酸位置133～142の領域で終わる。いくつかの態様において、任意の変異が導入され得るN末端短縮ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、最小ストレプトアビジンは、Ala13位～Ser139位のアミノ酸配列を含み、任意で、Ala13の代わりにN末端メチオニン残基を有する。本願の目的上、アミノ酸位置の番号は、全体を通して、SEQ ID NO:1に示されるwt-ストレプトアビジンの番号を参照する。（Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 1871-1882を参照のこと、図3も参照のこと）。

【0197】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、米国特許第6,103,493号に記載される変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンのアミノ酸配列に基づくアミノ酸位置44～53の領域内に少なくとも1つの変異を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数の残基44、45、46および／または47に変異を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの44位のGluから疎水性脂肪族アミノ酸、例えばVal、Ala、IleもしくはLeuへの置換、45位の任意のアミノ酸、46位の脂肪族アミノ酸、例えば疎水性脂肪族アミノ酸および／または47位のValから塩基性アミノ酸、例えばArgもしくはLys、例えば通常Argへの置換を含む。いくつかの態様において、Alaが46位にありおよび／またはArgが47位にありおよび／またはValもしくはIleが44位にある。いくつかの態様において、ストレプトアビジン変異体は、例えばSEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含む例示的なストレプトアビジンムテイン（ストレプトアビジン変異体1、SAM1としても公知）に示される、残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:5または6に示されるアミノ酸配列を含む例示的なストレプトアビジンムテイン（SAM2としても公知）に示される、残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含

む。いくつかの例において、そのようなストレプトアビジンムテインは、例えば、米国特許第6,103,493号に記載されており、Strep-Tactin（登録商標）という商標の下で市販されている。

【0198】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、国際公開PCT出願番号WO 2014/076277に記載される変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置でいうアミノ酸位置44～53の領域に少なくとも2つのシステイン残基を含む。いくつかの態様において、システイン残基は、これらのアミノ酸を連結するジスルフィド架橋を形成するよう45位および52位に存在する。そのような態様において、アミノ酸44は典型的にグリシンまたはアラニンであり、アミノ酸46は典型的にアラニンまたはグリシンであり、アミノ酸47は典型的にアルギニンである。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置でいうアミノ酸残基115～121の領域に少なくとも1つの変異またはアミノ酸の相違を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、アミノ酸位置117、120および121における少なくとも1つの変異ならびに／またはアミノ酸位置118および119の欠失ならびに少なくともアミノ酸121の置換を含む。

【0199】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、117位に対応する位置に変異を含み、その変異は、Trp、TyrもしくはPheのような大型疎水性残基またはGlu、AspもしくはArgのような荷電残基またはAsnもしくはGlnのような親水性残基またはいくつかの例では疎水性残基Leu、MetもしくはAlaまたは極性残基Thr、SerもしくはHisであり得る。いくつかの態様において、117位の変異は、SerまたはAlaまたはGlyのような小型残基であり得る120位に対応する位置における変異、ならびに疎水性残基、例えばTrp、TyrまたはPheのようなかさ高い疎水性残基であり得る121位に対応する位置における変異と組み合わせられる。いくつかの態様において、117位の変異は、疎水性残基、例えばLeu、Ile、MetもしくはValまたは通常TyrもしくはPheであり得るSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性なフラグメントの120位に対応する位置における変異、およびGly、AlaもしくはSerのような小型残基であり得るSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性なフラグメントとの比較で121位に対応する位置における変異、またはGln、またはLeu、Val、Ile、Trp、Tyr、PheもしくはMetのような疎水性残基と組み合わせられる。いくつかの態様において、そのようなムテインはまた、残基Val44-Thr45-Ala46-Arg47または残基Ile44-Gly45-Ala46-Arg47を含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121を含む。いくつかの態様において、ムテインストレプトアビジンは、SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含み、残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121を含み、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに結合する機能的活性を示す。

【0200】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、上記変異のいずれかを任意の組み合わせで含み得、得られるストレプトアビジンムテインは、ペプチドリガンド（Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly；Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）に対して 2.7×10^{-4} M未満および／またはペプチドリガンド（Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys；Strep-tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）に対して 1.4×10^{-4} M未満および／またはSEQ ID NO:7～19のいずれかに示されるペプチドリガンドのいずれかにに対して 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} Mもしくは 1×10^{-7} M未満であるが通常 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} Mもしくは 1×10^{-11} Mより大きい結合親和性を示し得る。

【0201】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:3~6、27もしくは28のいずれかに示されるアミノ酸配列またはSEQ ID NO:3~6、27もしくは28のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を示し、かつペプチドリガンド (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; Strep-tag (登録商標) とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される) に対して 2.7×10^{-4} M未満および/またはペプチドリガンド (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) に対して 1.4×10^{-4} M未満および/またはSEQ ID NO:7~19のいずれかに示されるペプチドリガンドのいずれかに示される 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} Mもしくは 1×10^{-7} M未満であるが通常 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} Mもしくは 1×10^{-11} Mより大きい結合親和性を示す。

【0202】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインはまた、他のストレプトアビジンリガンド、例えば、非限定的に、ビオチン、イミノビオチン、リボ酸、デスチオビオチン、ジアミノビオチン、HABA (ヒドロキシアゾベンゼン安息香酸) および/またはジメチルHABAに対する結合を示す。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:7~19のいずれかに示されるビオチン模倣ペプチドリガンドに対するストレプトアビジンムテインの結合親和性よりも大きい別のストレプトアビジンリガンド、例えばビオチンまたはデスチオビオチンに対する結合親和性を示す。したがって、いくつかの態様において、ビオチンまたはビオチン類似体もしくは誘導体 (例えば、デスチオビオチン) は、提供される方法において競合試薬として使用され得る。例えば、例として、(例えば、SEQ ID NO:4に示される配列を含む) Strep-tactin (登録商標) と命名されたムテインストレプトアビジンと、(例えば、SEQ ID NO:8に示される) Strep-tag (登録商標) IIと命名されたペプチドリガンドとの相互作用は、ビオチン・ストレプトアビジン相互作用に関するおよそ 10^{-13} Mとの比較で、およそ 10^{-16} Mの K_D の結合親和性によって特徴づけられる。いくつかの例において、Strep-tactin (登録商標) に対して $10^{-10} \sim 10^{-13}$ Mの間または約 $10^{-10} \sim 10^{-13}$ Mの間の K_D の高い親和性で結合し得るビオチンは、この結合部位に関してStrep-tag (登録商標) IIと競合し得る。

【0203】

いくつかの例において、試薬は、遷移金属イオンに結合することが可能であり得る少なくとも2つのキレート基Kを含む。いくつかの態様において、試薬は、オリゴヒスチジン親和性タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、カルモジュリンもしくはそれらの類似体、カルモジュリン結合性ペプチド (CBP)、FLAGペプチド、HAタグ、マルトース結合性タンパク質 (MBP)、HSVエピトープ、mycエピトープおよび/またはビオチニル化担体タンパク質に結合することが可能であり得る。

【0204】

いくつかの態様において、試薬は、オリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、自然界でみられるタンパク質の個別分子を直接的もしくは間接的に連結することによって、または単量体の個別分子もしくは個別分子を形成するサブユニットの複合体を直接的もしくは間接的に連結する (例えば、自然界でみられるタンパク質の二量体、三量体、四量体等を直接的もしくは間接的に連結することによってのいずれかで生成され得る。例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンの四量体ホモ二量体またはヘテロ二量体は、各オリゴマーまたはポリマーの個別分子または最小構成単位と称され得る。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、タンパク質の少なくとも2つの個別分子の連結を含み得る (すなわち、2マーである) またはタンパク質 (例えば、単量体、四量体) の個別分子の少なくとも3マー、4マー、5マー、6マー、7マー、8マー、9マー、10マー、11マー、12マー、13マー、14マー、15マー、16マー、17マー、18マー、19マー、20マー、25マー、30マー、35マー、40マー、45マーまたは50マーであり得る。

【0205】

オリゴマーは、例えば公開された米国特許出願番号US2004/0082012に記載されるような、当技術分野で公知の任意の方法を用いて生成され得る。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、例えば多糖または二官能性リンカーによって架橋され得る2つまたはそれ以上の個別分子を含む。

【0206】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、個別分子または多糖の存在下で個別分子を形成するサブユニットの複合体を架橋することによって得られる。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、多糖、例えばデキストランへのカルボキシル残基の導入によって調製され得る。いくつかの局面において、試薬（例えば単量体、四量体）の個別分子は、従来のカルボジイミド化学を用いて、内部リジン残基の一級アミノ基および／または遊離N末端を通じてデキストラン骨格のカルボキシル基に連結され得る。いくつかの態様において、連結試薬は、デキストラン1モル当たり試薬（例えば単量体、四量体）の個別分子約60モルのモル比で使用される。

【0207】

いくつかの態様において、試薬は、1つまたは複数のストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンの任意の類似体もしくはムテインまたはアビジンの類似体もしくはムテイン（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、結合部位Zは、アビジンまたはストレプトアビジンの天然のビオチン結合部位であり、個別分子内に最大4つの結合部位が存在し得（例えば、四量体は、4つの結合部位Zを含み）、それによってホモ四量体は、同じである最大4つの結合部位、すなわちZ1を含み得、ヘテロ四量体は、例えばZ1およびZ2を含む、異なり得る最大4つの結合部位を含み得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、同じストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンまたはアビジンムテインの複数の個別分子（例えば、複数のホモ四量体）から生成または生産され、この例で、オリゴマーの各結合部位Z、例えばZ1は同じである。例えば、いくつかの例において、オリゴマーは、複数の結合部位Z1、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の結合部位Z1を含み得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインのヘテロ四量体であり得る複数の個別分子から、および／またはそれらの結合部位Z、例えばZ1およびZ2に関して異なるストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインの複数の2つもしくはそれ以上の異なる個別分子（例えば、異なるホモ四量体）から生成または生産され、この例で、複数の異なる結合部位Z、例えばZ1およびZ2が、オリゴマー内に存在し得る。例えば、いくつかの例において、オリゴマーは、複数の結合部位Z1および複数の結合部位Zを含み得、合わせて、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の総結合部位Z1およびZ2を含み得る。

【0208】

いくつかの例において、各オリゴマーまたはポリマーは、多糖によって架橋され得る。1つの態様において、ストレプトアビジンまたはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーは、最初の工程で、本質的にNoguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137に記載されるように、カルボキシル残基を多糖、例えばデキストランに導入することによって調製され得る。いくつかのそのような局面において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれらの類似体は、次に、第2工程で、従来のカルボジイミド化学を用いて、内部リジン残基の一級アミノ基および／または遊離N末端を通じてデキストラン骨格のカルボキシル基に連結され得る。いくつかの例において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意の類似体の架橋オリゴマーま

たはポリマーはまた、リンカーとして機能する二官能性分子、例えばグルタルアルデヒドを通じてまたは当技術分野で報告されている他の方法によって架橋することによって取得され得る。

【0209】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、二官能性リンカーもしくは他の化学リンカー、例えばグルタルジアルデヒドを用いて、または当技術分野で公知の他の方法によって、個別分子または個別分子を形成するサブユニットの複合体を架橋することによって得られる。いくつかの局面において、ストレプトアビジンもしくはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意のムテインもしくは類似体の架橋オリゴマーまたはポリマーは、リンカーとして機能する二官能性分子、例えばグルタルジアルデヒドを通じてまたは当技術分野で報告されている他の方法によって個々のストレプトアビジンまたはアビジン分子を架橋することによって取得され得る。例えば、ストレプトアビジンムテインにチオール基を導入することによってストレプトアビジンムテインのオリゴマーを生成することが可能である（これは、例えば、ストレプトアビジンムテインと2-イミノチオラン（Trauts試薬）を反応させることによっておよび、例えば、別の反応においてストレプトアビジンムテイン中の利用可能なアミノ基を活性化させることによって行われ得る）。いくつかの態様において、このアミノ基の活性化は、ストレプトアビジンムテインと市販のヘテロ二官能性架橋剤、例えばスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホSMCC）またはスクシンイミジル6-[(β-マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート（SMPH）の反応によって達成され得る。いくつかのそのような態様において、それによって得られる2つの反応産物が混合され、それによって典型的に修飾ストレプトアビジンムテインの1つのバッチに含まれるチオール基と、修飾ストレプトアビジンムテインの他のバッチの（例えば、マレイミド機能によって）活性化されたアミノ酸を反応させる。いくつかの例において、この反応により、ストレプトアビジンムテインの多量体／オリゴマーが形成される。これらのオリゴマーは、任意の適当な数、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50またはそれ以上の個別分子を有し得、そのオリゴマー化度は、反応条件によって異なり得る。

【0210】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマー試薬は、サイズ排除クロマトグラフィーを通じて単離され得、任意の望ましい画分が試薬として使用され得る。例えば、いくつかの態様において、2-イミノチオランおよびヘテロ二官能性架橋剤、例えばスルホSMCCの存在下で修飾ストレプトアビジンムテインを反応させた後、オリゴマーまたはポリマー試薬は、サイズ排除クロマトグラフィーを通じて単離され得、所望の望ましい画分が試薬として使用され得る。いくつかの態様において、オリゴマーは、単一の分子量を有さない（かつ有する必要がない）が、それらは統計的な重量分布、例えばガウス分布を示し得る。いくつかの例において、4つ以上のストレプトアビジンまたはムテイン四量体、例えばホモ四量体またはヘテロ四量体、例えば、通常、3～50個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体、10～40個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体、または25～35個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体を含む任意のオリゴマーが、可溶性試薬として使用され得る。オリゴマーは、例えば、3～25個のストレプトアビジンムテイン四量体、例えばホモ四量体またはヘテロ四量体を有し得る。いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインの分子量が約50 kDaである場合、可溶性オリゴマーは、約150kDa～約2000 kDa、約150 kDa～約1500 kDa、約150 kDa～約1250 kDa、約150 kDa～1000 kDa、約150 kDa～約500 kDaまたは約150 kDa～約300 kDa、約300 kDa～約2000 kDa、約300 kDa～約1500 kDa、約300 kDa～約1250 kDa、約300 kDa～1000 kDa、約300 kDa～約500 kDa、約500 kDa～約2000 kDa、約500 kDa～約1500 kDa、約500 kDa～約1250 kDa、約500 kDa～1000 kDa、約1000 kDa～約2000 kDa、約1000 kDa～約1500 kDa、約1000 kDa～約1250 kDa、約1250 kDa～約2000 kDaまたは約1500 kDa～約2000 kDaの分子量を

有し得る。通常、各ストレプトアビジン分子／ムテインは4つのビオチン結合部位を有するので、そのような試薬は12～160個の結合部位Z、例えば12～100個の結合部位Zを提供し得る。

【0211】

B. 試薬の形式

1. 支持体

いくつかの態様において、試薬は、支持体、例えば固体支持体もしくは表面、例えばビーズ、または固定相（クロマトグラフィーマトリクス）に含まれる。いくつかのそのような態様において、試薬は、支持体に可逆的に固定化される。いくつかの例において、試薬は、共有結合を通じて支持体に固定化される。いくつかの局面において、試薬は、非共有結合により支持体に可逆的に固定化される。

10

【0212】

いくつかの態様において、支持体は、固体支持体である。任意の固体支持体（表面）が、試薬の可逆的固定化のために使用され得る。試薬を固定化することができる固体支持体の実例は、磁気ビーズ、ポリマービーズ、細胞培養プレート、マイクロタイタープレート、メンブレンまたは中空繊維を含む。いくつかの局面において、中空繊維が、TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA) から入手可能なQuantum（登録商標）Cell Expansion Systemにおけるバイオリアクターとして使用され得る。いくつかの態様において、試薬は、固体支持体に共有結合により付加される。他の態様において、例えばプラスチック基材への固定化のために、非共有結合的相互作用も使用され得る。いくつかの態様において、試薬は、例えば、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンまたはアビジンムテインであり得る。そのようなストレプトアビジンムテインは、任意の表面、例えば、クロマトグラフィー精製のために使用される、IBA GmbH, Gottingenから市販されている樹脂（ビーズ）、例えば、Strep-Tactin（登録商標）セファロース、Strep-Tactin（登録商標）Superflow（登録商標）、Strep-Tactin（登録商標）Superflow（登録商標）強化型またはStrep-Tactin（登録商標）MacroPrep（登録商標）に、共有結合により付加され得る。商業的に容易に入手可能な他の実例は、オリゴヒスチジンタグ付加（hisタグ付加）タンパク質の可逆的固定化のために、例えば、オリゴヒスチジンタグ、例えばペンタまたはヘキサヒスチジンタグを結合パートナーCとして含む作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の可逆的結合のために、使用され得る、固定化金属親和性クロマトグラフィー（IMAC）樹脂、例えば、TALON（登録商標）樹脂（Westburg, Leusden, The Netherlands）である。他の例は、グルタチオンが結合する結合パートナーCとしてのカルモジュリン結合ペプチドまたはセファロースを含む作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）と共に使用され得る、GE Life Sciencesから入手可能なカルモジュリンセファロースを含む。いくつかのそのような例において、結合パートナーCは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼである。

20

30

【0213】

いくつかの態様において、支持体は、固定相を含む。したがって、いくつかの態様において、試薬は、固定相（クロマトグラフィーマトリクスとも呼ばれる）に含まれる。いくつかのそのような態様において、試薬は、固定相に可逆的に固定化される。いくつかの例において、試薬は、共有結合を通じて固定相に可逆的に固定化される。いくつかの局面において、試薬は、非共有結合により固定相に可逆的に固定化される。

40

【0214】

任意の材料が、クロマトグラフィーマトリクスとして使用され得る。一般に、適当なクロマトグラフィー材料は、例えば、充填されたクロマトグラフィーカラムにおいて所望の条件下で使用される際に、本質的に無害なものの、すなわち、細胞の生存度に対して弊害をもたらさないものである。いくつかの態様において、固定相は、予め定められた場所、例えば、予め定められた位置で維持され、それに対して試料の場所が移動する。したがって、いくつかの態様において、固定相は、移動相が（フロースルーによりまたはバッチモードでのいずれかで）流動し、相間で（溶解したまたは分散したのいずれかの）液体相中に

50

含まれる成分の分配が生じる、クロマトグラフィーシステムの一部である。

【0215】

いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、固体または半固体相の形態を有し、単離／分離したい標的細胞を含む試料は液体相である。クロマトグラフィーマトリクスは、（任意の適当なサイズおよび形状の）特定の材料または紙基材もしくはメンブレンを含むモノリシックなクロマトグラフィー材料である。したがって、いくつかの局面において、クロマトグラフィーは、カラムクロマトグラフィーおよび平面クロマトグラフィーの両方であり得る。いくつかの態様において、標準的なクロマトグラフィーカラムに加えて、双方向の流れを実現するカラム、例えばPhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A. から入手可能なPhyTip（登録商標）カラムまたはピペットチップが、カラムベース／フロースルーモードベースの方法で使用され得る。したがって、いくつかの例において、双方向の流れを実現するピペットチップまたはカラムもまた、本発明の方法において有用なクロマトグラフィーカラムに含まれる。いくつかの例において、例えば粒状のマトリクス材料が使用される場合、粒状のマトリクス材料は、例えば、約5 μ m～約200 μ m、または約5 μ m～約400 μ m、または約5 μ m～約600 μ mの平均粒子サイズを有し得る。いくつかの局面において、クロマトグラフィーマトリクスは、例えば、ポリマー樹脂または金属酸化物または半金属酸化物であり得るかまたはそれらを含み得る。いくつかの局面において、例えば平面クロマトグラフィーが使用される場合、マトリクス材料は、平面クロマトグラフィーに適した任意の材料、例えば、従来のセルロースベースもしくは有機ポリマーベースのメンブレン（例えば、紙製メンブレン、ニトロセルロースメンブレンもしくはフッ化ポリビニリデン（PVDF）メンブレン）またはシリカコーティングされたガラスプレートであり得る。1つの態様において、クロマトグラフィーマトリクス／固定相は、非磁性材料または非磁化性材料である。

【0216】

いくつかの態様において、本発明の方法に適した非磁性または非磁化性クロマトグラフィー固定相は、誘導体化シリカまたは架橋ゲルを含む。いくつかの局面において、架橋ゲルは、天然ポリマー、例えば自然界で発生するポリマークラスのものに基つき得る。例えば、クロマトグラフィー固定相の基礎となり得る天然ポリマーは、多糖である。いくつかの例において、各多糖は、通常、架橋される。多糖マトリクスの例は、アガロースゲル（例えば、Superflow（商標）アガロースまたはSephacryl（登録商標）材料、例えば異なるビーズおよび孔サイズで市販されているSuperflow（商標）Sephacryl（登録商標））または架橋デキストランのゲルを含むがこれらに限定されない。さらなる実例は、共にGE Healthcareから入手可能な、Sephadex（登録商標）またはSuperdex（登録商標）として（様々なビーズサイズおよび様々な孔サイズで）市販されている、デキストランが共有結合される粒状架橋アガロースマトリクスである。そのようなクロマトグラフィー材料の別の実例は、Sephacryl（登録商標）であり、これもGE Healthcareから異なるビーズおよび孔サイズで入手可能である。

【0217】

いくつかの態様において、架橋ゲルはまた、合成ポリマー、例えば自然界で発生しないポリマークラスのものに基つき得る。いくつかの局面において、クロマトグラフィー固定相の基礎となるそのような合成ポリマーは、極性単量体単位を有し、したがってそれ自体が極性であるポリマーである。したがって、いくつかの例において、そのような極性ポリマーは、親水性である。疎油性とも称される親水性分子は、いくつかの局面において、水分子と双極子・双極子相互作用を形成し得る部分を含む。一般に、親油性とも称される疎水性分子は、水から分離する傾向を有する。

【0218】

適当な合成ポリマーの実例は、ポリアクリルアミド、スチレンジビニルベンゼンゲルならびにアクリレートおよびジオールまたはアクリルアミドおよびジオールのコポリマーである。実例は、Fractogel（登録商標）として市販されているポリメタクリレートゲルである。さらなる例は、Toyopearl（登録商標）として市販されているエチレングリコール

およびメタクリレートのコポリマーである。いくつかの態様において、クロマトグラフィー固定相はまた、天然および合成ポリマー成分、例えば、複合マトリクスもしくは複合材または多糖およびアガロースのコポリマー、例えばポリアクリルアミド／アガロース複合材、または多糖およびN,N'-メチレンビスアクリルアミドのコポリマーを含み得る。デキストランおよびN,N'-メチレンビスアクリルアミドのコポリマーの実例は、上記のSephacryl（登録商標）シリーズの材料である。いくつかの態様において、誘導体化シリカは、合成または天然ポリマーに連結されたシリカ粒子を含み得る。そのような態様の例は、多糖結合シリカ、ポリビニルピロリドン結合シリカ、ポリエチレンオキシド結合シリカ、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド)シリカおよびポリ(N'-イソプロピルアクリルアミド)結合シリカを含むがこれらに限定されない。

10

【0219】

いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、例えば本明細書に記載される除去カートリッジにおいて使用される場合、ゲル濾過マトリクスである。一般に、ゲル濾過は、それが起こるよう設計された特性によって特徴づけられ得る。したがって、ゲル濾過マトリクスは、いくつかの局面において、概ねそれらのサイズに基づいて細胞または他の生物学的物体の分離を実現する。いくつかのそのような局面において、各クロマトグラフィーマトリクスは典型的に、上記のような粒状多孔性材料である。クロマトグラフィーマトリクスは、特定の排除限界を有し得、排除限界は典型的に、それを上回ると分子が孔に侵入できず完全に除去される分子量という点から定義される。いくつかの態様において、サイズ排除限界を定義する各分子量は、標的細胞の重量に対応する重量を下回るよう選択され得る。そのような態様において、標的細胞は、サイズ排除クロマトグラフィーマトリクスの孔に侵入することが妨げられる。同様に、固定相は、選択された標的細胞のサイズよりも小さいサイズの孔を有し得る。例示的な態様において、クロマトグラフィーマトリクスは、0～約500 nmの平均孔サイズを有する。

20

【0220】

いくつかの態様において、試料中に存在する成分、例えば作用物質（例えば、受容体結合物質もしくは選択物質）または競合試薬は、孔の排除限界を下回るサイズを有し得、したがってクロマトグラフィーマトリクスの孔に侵入し得る。いくつかの局面において、部分的または完全に孔容積に侵入することができるそのような成分のうち、孔容積に対するアクセス性が低いより大きな分子が最初に溶出し得、最も小さい分子は典型的に最後に溶出する。いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリクスの排除限界は、標的細胞の最大幅を下回るよう選択される。したがって、いくつかの局面において、孔容積に対するアクセス性を有する成分は、標的細胞よりもクロマトグラフィーマトリクス内または上でより長く維持され得る。したがって、いくつかの例において、標的細胞は、試料の他の物体／成分から分離されてクロマトグラフィーカラムの溶出物中に回収され得る。したがって、いくつかの局面において、成分、例えば作用物質（例えば、受容体結合物質もしくは選択物質）、または適用可能な場合、競合試薬は、標的細胞よりも後の時点でゲル濾過マトリクスから溶出し得る。いくつかの態様において、例えば、ゲル透過マトリクスが、試料中に存在する作用物質（例えば、受容体結合物質もしくは選択物質）および／または競合試薬に結合することができる結合部位Zを含む（例えば、それに共有結合された）試薬を含む場合に、この効果はさらに増加する。いくつかの例において、作用物質（例えば、受容体結合物質もしくは選択物質）および／または競合試薬は、試薬の結合部位Zによって結合され得、それによってマトリクス上に固定化され得る。いくつかの局面において、この方法は、除去カートリッジにおいて実施される。

30

40

【0221】

いくつかの態様において、本発明の方法において使用されるクロマトグラフィーマトリクスはまた、磁氣的に誘引可能な物体、例えば1つまたは複数の磁氣的に誘引可能な粒子または磁性流体を含み得る。各々の磁氣的に誘引可能な粒子は、標的細胞に結合することができる結合部位を有する試薬を含み得る。いくつかの例において、磁氣的に誘引可能な粒子は、反磁性、強磁性、常磁性または超常磁性材料を含み得る。一般に、超常磁性材料

50

は、永久磁化を起こすことなく誘起磁場による磁場に反応する。酸化鉄に基づく磁気粒子は、例えば、Dynal BiotechからDynabeads、Miltenyi Biotecから磁性MagneticBeadsとして、CPG Inc.,から磁性多孔性ガラスビーズとして、および様々な他の販売元、例えば、いくつか挙げると、Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.,、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences、またはNovagen Inc.から、市販されている。超常磁性CoおよびFeCoならびに強磁性Coナノ結晶に基づく磁性ナノ粒子が、例えばHutten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63)によって報告されている。他の態様において、本発明の方法において使用されるクロマトグラフィーマトリクスは、任意の磁氣的に誘引可能な物体のくぼみである。

【0222】

いくつかの態様において、第1および第2の固定相の少なくとも1つの配置、例えば細胞の選択のためのクロマトグラフィーカラム（選択カートリッジ）および試薬の除去のための第2のクロマトグラフィーカラム（除去カートリッジ）を含む装置が提供される。装置は、直列に流体接続されている第1および第2の固定相（クロマトグラフィーカラム）の複数の配置を含み得る。装置は、第1および第2の固定相の第1の配列の第1の固定相に流体接続されている試料投入口を含み得る。いくつかの態様において、装置はまた、クロマトグラフィー用の第1および第2の固定相の少なくとも1つの配置の最後の第2の固定相に流体接続されている、細胞のための試料流出口を含み得る。いくつかの局面において、装置はまた、第1および第2の固定相の配置の第1の固定相の少なくとも1つに流体接続されている競合試薬容器を含み得る。

【0223】

2. 可溶物

いくつかの態様において、試薬は、固体支持体に結合されない、すなわち、それは可溶性形態で存在するかまたは可溶性である。原則として、支持体、例えば固体支持体または固定相に固定化される試薬の場合と同じ試薬が使用され得る。例えば、上記の試薬の任意の例が、そのような試薬を支持体に固定化または付加することなく、例えば、固体支持体または固定相に付加せずに使用され得る。いくつかの態様において、試薬は、結合パートナーCとの相互作用を通じた結合物質への可逆的結合のための複数の結合部位Zを含む。いくつかの例において、試薬は、個別分子のオリゴマーもしくはポリマー、または個別分子を形成するサブユニットの複合体のオリゴマーもしくはポリマー（例えば、二量体、三量体もしくは四量体タンパク質のオリゴマーもしくはポリマー）である。いくつかの態様において、試薬は、例えば、ストレプトアビジンムテインオリゴマー、カルモジュリンオリゴマー、あるいは、遷移金属イオンに結合することができ、それによってその試薬をオリゴヒスチジン親和性タグ、多量体グルタチオン-S-トランスフェラーゼまたはビオチニル化担体タンパク質に結合できるようにする少なくとも2つのキレート基Kを提供する化合物（オリゴマー）であり得る。

【0224】

いくつかの態様において、試薬は、試薬に付加された固体支持体（表面）の不存在により特徴づけられる。例えば、いくつかの態様において、試薬は、粒子、ビーズ、ナノ粒子、マイクロスフィアまたは他の固体支持体を含まないかまたはそれらに（直接的もしくは間接的に）付加されない。いくつかの態様において、試薬は、硬直的な、柔軟性のないもしくは堅いものではない、または硬直的な、柔軟性のないもしくは堅い表面を含まないかもしくはそれに付加されない。いくつかの態様において、試薬は、柔軟であるまたは実質的に柔軟である。いくつかの例において、試薬は、細胞の表面の形状に対して調節するまたは適合させることができる。いくつかの態様において、試薬は、球形または実質的に球形の形状を含まない。

【0225】

いくつかの態様において、試薬の実質的にすべて、すなわち、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超またはそれ以上が、有機物である、有機物から構成されるまたは有機物を含む。例えば、いくつかの態様において、試薬の

80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超またはそれ以上が、脂質、糖質、タンパク質、ペプチドもしくはそれらの混合物である、それらから構成されるまたはそれらを含む。いくつかの態様において、試薬は、無機物、無機コア、例えば金属、例えば鉄、合成または無機ポリマー、例えばスチレンポリマー、例えばポリスチレン、ラテックス、シリカもしくは磁性コアを本質的に含まない、本質的にそれらから構成されないまたは本質的にそれらを含まない。例えば、いくつかの態様において、試薬の一部として含まれる試薬における無機物の相対パーセンテージは、20%、15%、10%、5%未満またはそれより少ない。

【0226】

いくつかの態様において、水溶液中の試薬の全体の大部分（すなわち、50%超）、例えば60%、70%、80%、90%、95%、99%超またはそれ以上は、試薬を含む個別タンパク質分子、例えば個別分子または個別分子を形成するサブユニットの複合体（例えば、四量体分子）のオリゴマーもしくはポリマーからなる。いくつかの態様において、可溶性試薬の総密度は、 1.2 g/cm^3 、 1.1 g/cm^3 、 1.0 g/cm^3 未満またはそれより小さい。

【0227】

いくつかの態様において、例えば支持体または固体支持体に付加されていない（例えば、ビーズに付加されていない）可溶性試薬は、比較的小さいサイズ、例えば、通常、20 nM未満または約20 nM未満のサイズ、例えば、15 nM未満もしくは約15 nM未満、10 nM未満もしくは約10 nM未満、5 nM未満もしくは約5 nM未満、またはそれより小さい。

【0228】

いくつかの態様において、例えば支持体または固体支持体に付加されていない（例えば、ビーズに付加されていない）可溶性試薬は、生物学的に不活性である、すなわち、それは生細胞に対して非毒性である。いくつかの態様において、試薬は生分解性であり得る、例えば、それは酵素的活性によって分解され得るまたは食細胞によって除去され得る。

【0229】

いくつかの態様において、試薬（例えば、ストレプトアビジンまたはムテイン、例えば四量体ストレプトアビジンムテイン）を担体、例えば有機担体に反応させることが可能である。いくつかの局面において、多糖との反応に加えて、担体タンパク質として生理学的または薬学的に許容されるタンパク質、例えば血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）またはウシ血清アルブミン（BSA））を使用することも可能である。そのような例において、試薬、例えば、（個別の四量体としてまたはオリゴマーの形態のいずれかの）ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、非共有結合的相互作用を通じて担体タンパク質に連結され得る。いくつかのそのような態様において、（様々な販売元、例えば、いくつか挙げるとThermoFisher Scientific、Sigma AldrichまたはVectorlabs、から市販されている）ビオチニル化BSAを、試薬（例えば、ストレプトアビジンムテイン）と反応させることができる。いくつかの局面において、試薬オリゴマー（例えば、ストレプトアビジンオリゴマー）の一部は、オリゴマーの結合部位Zの大部分を作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）および本明細書に記載される任意のさらなる作用物質との結合に利用可能な状態で残しつつ、1つまたは複数の結合部位Zを通じて、ビオチニル化担体タンパク質に非共有結合的に連結され得る。したがって、そのようなアプローチによって、複数の結合部位Zを有する可溶性試薬が調製され得る。

【0230】

他の態様において、試薬、例えば、（個別の四量体としてまたはオリゴマーの形態のいずれかの）ストレプトアビジンムテインは、合成担体、例えばポリエチレングリコール（PEG）分子に、共有結合的に連結され得る。任意の適当なPEG分子が、例えば、この目的で使用され得、PEG分子および各試薬は可溶性であり得る。典型的に、1000 Daの分子量までのPEG分子は、本発明の方法において使用され得る水または培養培地に可溶性である。いくつかの例において、そのようなPEGベースの試薬は、市販の活性化PEG分子（例えば、NOF North America Corporation, Irvine, California, USAから入手可能なPEG-NHS誘導体またはCreative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USAから入手可能な活性化PE

10

20

30

40

50

G誘導体)とストレプトアビジウムテインのアミノ基とを用いて調製され得る。

【0231】

C. 作用物質

いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、細胞の表面上の分子、例えば、細胞表面分子に結合するための1つまたは複数の結合部位Bを有する。したがって、いくつかの例において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、1つの結合部位Bまたは複数の結合部位Bを含み、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）と標的細胞の表面上の分子との間の特異的結合は、Bと分子との間の相互作用を含む。いくつかの態様において、作用物質は、1つの結合部位しか含まない、すなわち一価である。いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、細胞表面分子に結合することができる少なくとも2つ、例えば、3つ、4つまたは5つの結合部位Bを含む複数の結合部位Bを有する。いくつかのそのような局面において、少なくとも2つまたは複数の結合部位Bは、同一であり得る。いくつかの態様において、少なくとも2つまたは複数の結合部位Bの1つまたは複数の、異なり得る（例えば、B1およびB2であり得る）。

【0232】

いくつかの態様において、1つまたは複数の異なる作用物質（例えば、1つまたは複数の異なる受容体結合物質、選択物質または細胞上の分子に結合する他の作用物質）は、試薬に可逆的に結合する。いくつかの態様において、少なくとも2つ、3つ、4つまたはそれ以上の異なる作用物質は、同じ試薬に可逆的に結合する。いくつかの態様において、少なくとも2つの異なる作用物質が同じ試薬に可逆的に結合し、各試薬は、作用物質と分子との間の特異的結合のための1つの結合部位Bまたは複数の結合部位Bを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つまたはそれ以上の作用物質は、例えば、同じまたは実質的に同じ分子への結合のための、同じ結合部位Bを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つまたはそれ以上の作用物質は、例えば異なる分子への結合のための、異なる結合部位Bを含む。いくつかの態様において、第1の作用物質（例えば、第1の受容体結合物質または第1の選択物質）は、結合部位B1、B2、B3、B4等を含み、第2の作用物質（例えば、第2の受容体結合物質または第2の選択物質）は、結合部位B1、B2、B3、B4等のうちの別のものを含む。いくつかの態様において、第1の作用物質（例えば、第1の選択物質）は結合部位B1を含み、第2の作用物質（例えば、第2の選択物質）は結合部位B3を含む。いくつかの態様において、第1の作用物質（例えば、第1の受容体結合物質）は結合部位B2を含み、第2の作用物質（例えば、第2の受容体結合物質）は結合部位B4を含む。任意のそのような態様において、第1の作用物質および第2の作用物質は、結合パートナーC1またはC2を含み得る。いくつかの態様において、C1およびC2は同じであり得る。いくつかの態様において、C1およびC2は異なる。いくつかの態様において、第1の作用物質および第2の作用物質は、同じ結合パートナーC1を含む。

【0233】

いくつかの例において、（例えば、その結合部位Bを通じた）作用物質と試薬の結合部位Zとの間の結合の解離定数 (K_D) は、約 10^{-2} M～約 10^{-13} Mまたは約 10^{-3} M～約 10^{-12} Mまたは約 10^{-4} M～約 10^{-11} M、または約 10^{-5} M～約 10^{-10} Mの範囲の値を有し得る。いくつかの態様において、結合物質と分子との間の結合の解離定数 (K_D) は、低い親和性のもの、例えば、約 10^{-3} ～約 10^{-7} Mの範囲内である。いくつかの態様において、結合物質と分子との間の結合の解離定数 (K_D) は、高い親和性のもの、例えば、約 10^{-7} ～約 1×10^{-10} Mの範囲内である。

【0234】

いくつかの態様において、結合部位Bを通じた作用物質と分子との結合の解離は、例えば、試薬と作用物質との間の可逆的結合の破壊の後に、標的細胞が作用物質により一過的にのみ染色されるまたは作用物質と一過的にのみ結合するのに十分に早く起こる。いくつかの例において、 k_{off} 速度（（結合部位Bを通じた）作用物質と分子との間の結合の解離速度定数とも呼ばれる）で表現される場合、 k_{off} 速度は、約 0.5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ

10

20

30

40

50

以上、約 1×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 2×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 3×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 4×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1.5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 2×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 3×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 4×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上、約 1×10^{-2} 秒もしくはそれ以上、または約 5×10^{-1} 秒 $^{-1}$ もしくはそれ以上である。特定の作用物質と細胞の分子との相互作用に適した k_{off} 速度範囲を経験的に決定することは、当業者の技能の範囲内である（例えば、公開された米国出願番号US2014/0295458を参照のこと）。例えば、結合複合体の崩壊の後に作用物質の大部分が1時間以内に除去または分離され得るように、例えば 4.0×10^{-4} 秒 $^{-1}$ より大きい、比較的高い k_{off} 速度を有する作用物質が使用され得る。他の例において、結合複合体の崩壊の後に、作用物質の大部分が約3.5時間以内に細胞から除去または分離され得るように、例えば 1.0×10^{-4} 秒 $^{-1}$ の、低い k_{off} 速度を有する作用物質が使用され得る。

【0235】

いくつかの態様において、この結合の K_D ならびに作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の結合部位Bと細胞表面分子との間で形成される結合の K_D 、 K_A 、 k_{off} および k_{on} 速度は、任意の適当な手段によって、例えば蛍光滴定、平衡透析または表面プラズモン共鳴によって決定され得る。

【0236】

いくつかの局面において、細胞表面分子は、それに対して作用物質、例えば結合物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）が誘導され得る分子である。いくつかの態様において、細胞表面分子は、ペプチドまたはタンパク質、例えば受容体、例えば膜受容体タンパク質である。いくつかの態様において、受容体は、脂質、多糖または核酸である。いくつかの態様において、タンパク質である細胞表面分子は、表在性膜タンパク質または内在性膜タンパク質であり得る。細胞表面分子は、いくつかの態様において、膜をまたぐ1つまたは複数のドメインを有し得る。いくつかの実例として、膜貫通ドメインを有する膜タンパク質は、Gタンパク質共役受容体、例えば嗅覚受容体、ロドプシン受容体、ロドプシンフェロモン受容体、ペプチドホルモン受容体、味覚受容体、GABA受容体、オピエート受容体、セロトニン受容体、Ca $^{2+}$ 受容体、メラノプシン、アセチルコリン、ニコチン性、アドレナリン作用性、ノルエピネフリン、カテコールアミン、L-DOPA-、ドパミンおよびセロトニン（生体アミン、エンドルフィン／エンケファリン）神経ペプチド受容体を含む、神経伝達物質受容体、例えばリガンド依存性、電圧依存性または機械刺激依存性受容体、受容体キナーゼ、例えばセリン／スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ、ポーリン／チャンネル、例えば塩素チャンネル、カリウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、OMPタンパク質、ABCトランスポーター（ATP結合カセットトランスポーター）、例えばアミノ酸トランスポーター、Na-グルコーストランスポーター、Na/ヨウ化物トランスポーター、イオントランスポーター、例えば集光複合体、シトクロムcオキシダーゼ、ATPase Na/K、H/K、Ca、細胞接着受容体、例えばメタロプロテアーゼ、インテグリンまたはカドヘリンであり得る。

【0237】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、望ましい細胞集団またはサブ集団、例えば、血液細胞の集団またはサブ集団、例えばリンパ球（例えば、T細胞、Tヘルパー細胞、例えばCD4 $^{+}$ Tヘルパー細胞、B細胞もしくはナチュラルキラー細胞）、単球、または幹細胞、例えばCD34陽性末梢幹細胞またはNanogもしくはOct-4発現幹細胞を定義する抗原であり得る。T細胞の例は、CMV特異的CD8 $^{+}$ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および調節性T細胞（Treg）等の細胞を含む。Tregの実例は、CD4 CD25 CD45RA Treg細胞であり、メモリーT細胞の実例は、CD62L CD8 $^{+}$ 特異的セントラルメモリーT細胞である。細胞表面分子はまた、腫瘍細胞のマーカーであり得る。

【0238】

上記のように、いくつかの態様において、作用物質、例えば結合物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、細胞表面分子に結合することができる結合部位Bに加えて

、結合パートナーCを有する。いくつかの局面において、この結合パートナーCは、試薬の結合部位Zに結合することができ、試薬は、結合パートナーCに対する1つまたは複数の結合部位を有する。いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCと試薬の結合部位Zとの間で形成され得る非共有結合的な結合は、任意の所望の強度および親和性のものであり得、この方法を実施する条件下で破壊可能または可逆的であり得る。作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、2つ、3つまたはそれ以上を含む少なくとも1つのさらなる結合パートナーCを含み得、試薬は、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCに対する少なくとも2つ、例えば3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つまたはそれ以上の結合部位Zを含み得る。米国特許7,776,562、米国特許8,298,782または国際特許出願公開WO 2002/054065に記載されるように、結合パートナーCと1つまたは複数の対応する結合部位Zとを有する試薬の任意の組み合わせが、例えば、結合パートナーCおよび結合部位Zが、例えばアビディティ効果を生じるように、複合体内で可逆的に結合することができるように、選択され得る。

【0239】

作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCは、例えば、炭化水素ベース（ポリマーを含む）であり得、窒素、リン、硫黄、カルベン、ハロゲンまたはプソイドハロゲン基を含み得る。いくつかの局面において、それは、アルコール、有機酸、無機酸、アミン、ホスフィン、チオール、ジスルフィド、アルカン、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖、オリゴ糖または多糖であり得る。さらなる例として、それはまた、カチオン、アニオン、ポリカチオン、ポリアニオン、ポリカチオン、電解質、高分子電解質、カーボンナノチューブまたはカーボンナノフォームであり得る。通常、そのような結合パートナーCは、他の物体に対するよりも試薬の結合部位に対してより高い親和性を有する。各結合パートナーCの例は、クラウンエーテル、免疫グロブリン、それらのフラグメントおよび抗体様機能を有するタンパク質性結合分子を含むがこれらに限定されない。

【0240】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCは、ビオチンを含み、試薬は、ビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、試薬は、各々のビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジンまたはアビジン結合ペプチドを含み、試薬は、各々のストレプトアビジンまたはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。

【0241】

いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン、例えば、（例えばSEQ ID NO: 3~6に示される）上記の任意のものを含むストレプトアビジンムテインであり、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジン結合ペプチドを含み得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、SEQ ID NO:9に示される一般式を有する配列を含み得る、例えばSEQ ID NO:10に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。1つの例において、ペプチド配列は、

Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly

（Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。1つの例において、ペプチド配列は、

10

20

30

40

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) である。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、少なくとも2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続的配置を含み、2つのモジュール間の距離は少なくとも0かつ50アミノ酸以下であり、1つの結合モジュールは3〜8アミノ酸を有し、少なくとも配列His-Pro-Xaa (SEQ ID NO:9) を含み、Xaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンであり、他の結合モジュールは、(例えばSEQ ID NO:11に示される) 同じまたは異なるストレプトアビジンペプチドリガンドを有する(例えば、国際公開PCT出願番号W002/077018; 米国特許第7,981,632号を参照のこと)。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、SEQ ID NO:13または14のいずれかに示される式を有する配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは、SEQ ID NO:15〜19のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する。大部分の例において、すべてのこれらのストレプトアビジン結合ペプチドは、同じ結合部位、すなわちストレプトアビジンのビオチン結合部位に結合する。そのようなストレプトアビジン結合ペプチドの1つまたは複数がビオチンパートナーC、例えばC1およびC2として使用される場合、多量体形成試薬は典型的に、ストレプトアビジンムテインである。

10

【0242】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、さらに修飾され得る。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、ニッケル付加trisNTA (His-STREPPERまたはHis/Strep-tag (登録商標) IIアダプターとも呼ばれる) にコンジュゲートされたペプチド配列

20

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) を含み得る。

【0243】

いくつかの態様において、作用物質(例えば、受容体結合物質または選択物質)の結合パートナーCは、親和性タグとして当業者に公知の部分を含む。そのような態様において、試薬は、対応する結合パートナー、例えば、親和性タグに結合することが公知の抗体または抗体フラグメントを含み得る。公知の親和性タグのいくつかの実例として、作用物質(例えば、受容体結合物質または選択物質)に含まれる結合パートナーCは、ジニトロフェノールまたはジゴキシゲニン、オリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンDメイン、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)またはチオレドキシン、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、FLAGペプチド、

30

HAタグ(配列: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID NO: 20), VSV-Gタグ

(配列: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (SEQ ID NO: 21), HSVタグ

(配列: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (SEQ ID NO: 22), T7エピトープ

(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (SEQ ID NO: 22)

、マルトース結合タンパク質(MBP)、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dの配列

Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (SEQ ID NO: 24)

40

のHSVエピトープ、配列

Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (SEQ ID NO: 25)

の転写因子c-mycの「myc」エピトープ、V5タグ

(配列: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO: 26)

またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を含み得る。そのような態様において、抗体または抗体フラグメントであり得る試薬の1つまたは複数の結合部位Zと抗原との間で形成される複合体は、遊離抗原、すなわち遊離ペプチド(エピトープタグ)または遊離タンパク質(例えば、MBPもしくはCBP)を添加することによって競合的に妨げられ得る。いくつかの態様において、親和性タグはまた、オリゴヌクレオチドタグであり得る。いくつかの例において、そのようなオリゴヌクレオチドタグは、例えば、試薬に連結されたま

50

たは試薬に含まれる相補的配列を有するオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるために使用され得る。

【0244】

適当な結合パートナーCのさらなる例は、レクチン、プロテインA、プロテインG、金属、金属イオン、ニトリロ三酢酸誘導体 (NTA)、RGDモチーフ、デキストラン、ポリエチレンイミン (PEI)、レドックスポリマー、糖タンパク質、アプタマー、色素、アミロース、マルトース、セルロース、キチン、グルタチオン、カルモジュリン、ゼラチン、ポリミキシン、ヘパリン、NAD、NADP、リジン、アルギニン、ベンズアミジン、ポリUまたはオリゴdTを含むがこれらに限定されない。レクチン、例えばコンカバリンAは、多糖およびグリコシル化タンパク質に結合することが公知である。色素の実例は、NADH依存的酵素に特異的に結合するトリアジン色素、例えばCibacronブルーF3G-A (CB) またはレッドHE-3Bである。典型的に、グリーンAは、CoAタンパク質、ヒト血清アルブミンおよびデヒドロゲナーゼに結合する。いくつかの例において、色素7-アミノアクチノマイシンDおよび4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールは、DNAに結合する。一般に、金属、例えばNi、Cd、Zn、CoまたはCuのカチオンは、典型的に、親和性タグ、例えばヘキサヒスチジンまたはHis-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cysタグ(MAT タグ) (SEQ ID NO: 35)

およびN-メタクリロイル-(L)-システインメチルエステルを含むオリゴヒスチジン含有配列に結合させるために使用される。

【0245】

いくつかの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合物質または選択物質) に含まれる結合パートナーCと試薬の1つまたは複数の結合部位Zとの間の結合は、二価、三価または四価カチオンの存在下で生じる。これに関して、いくつかの態様において、試薬は、典型的には適当なキレート剤によって保持、例えば錯体化された、二価、三価または四価カチオンを含む。いくつかの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合物質または選択物質) に含まれる結合パートナーCは、二価、三価または四価カチオンを含む、例えば錯体を含む部分を含み得る。各々の金属キレート剤の例は、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、エチレングリコール四酢酸 (EGTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、N,N-ビス (カルボキシメチル) グリシン (ニトリロ三酢酸、NTAとも呼ばれる)、1,2-ビス (o-アミノフェノキシ) エタン-N,N,N',N'-四酢酸 (BAPTA)、2,3-ジメルカプト-1-プロパノール (ジメルカプロール)、プロフィンおよびヘムを含むがこれらに限定されない。例として、EDTAは、ほとんどの一価、二価、三価および四価金属イオン、例えば銀 (Ag^+)、カルシウム (Ca^{2+})、マンガン (Mn^{2+})、銅 (Cu^{2+})、鉄 (Fe^{2+})、コバルト (Co^+) およびジルコニウム (Zr^{4+}) と錯体を形成し、BAPTAは、 Ca^{2+} に特異的である。実例として、当技術分野で使用されている標準的な方法は、オリゴヒスチジntagとキレート剤ニトリロ三酢酸 (NTA) によって提示される銅 (Cu^{2+})、ニッケル (Ni^{2+})、コバルト (Co^{2+}) または亜鉛 (Zn^{2+}) イオンとの間の錯体の形成である。

【0246】

いくつかの態様において、例えば、米国特許第5,985,658号に記載されるように、作用物質 (例えば、受容体結合物質または選択物質) に含まれる結合パートナーCは、カルモジュリン結合ペプチドを含み、試薬は、多量体カルモジュリンを含む。いくつかの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合物質または選択物質) に含まれる結合パートナーCは、FLAGペプチドを含み、試薬は、FLAGペプチド、例えば、米国特許第4,851,341号に記載されるモノクローナル抗体4E11に結合するFLAGペプチド、に結合する抗体を含む。1つの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合物質または選択物質) に含まれる結合パートナーCは、オリゴヒスチジntagを含み、試薬は、オリゴヒスチジntagに結合する抗体または遷移金属イオンを含む。いくつかの態様において、すべてのこれらの結合錯体の分解は、例えばEDTAまたはEGTAを添加することによる、金属イオンキレート化、例えばカルシウムキレート化によって達成され得る。いくつかの態様において、カルモジュリン、抗体、例えば4E11またはキレート化金属イオンまたは遊離キレート剤は、従来の方法によって、例えば、ビオチニル化およびストレプトアビジンもしくはアビジンまたはそれ

らのオリゴマーとの錯体形成によって、または第1工程においてNoguchi, A, et al. Bioc onjugate Chemistry (1992) 3, 132-137に本質的に記載されるように多糖、例えばデキストランにカルボキシル残基を導入し、第2工程において従来のカルボジイミド化学を用いて、カルモジュリンまたは抗体またはキレート化金属イオンまたは遊離キレート剤を、一級アミノ基を通じて多糖、例えばデキストラン骨格のカルボキシル基に連結することによって、多量体化され得る。いくつかのそのような態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）に含まれる結合パートナーCと試薬の1つまたは複数の結合部位Zとの間の結合は、金属イオンキレート化によって妨げられ得る。金属キレート化は、例えば、EGTAまたはEDTAの添加によって達成され得る。

【0247】

いくつかの態様において、細胞表面分子に特異的に結合する作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、例えば、抗体、そのフラグメント、または抗体様機能を有するタンパク質性結合分子に含まれ得る。いくつかの態様において、作用物質の結合部位Bは、抗体結合部位である、例えば、抗体の1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）であるかまたはそれを含む。（組換え）抗体フラグメントの例は、Fabフラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント（scFv）、二価抗体フラグメント、例えばF(ab')₂ F(ab')₂フラグメント、ダイアボディ、トリアボディ（Iliades, P., et al, FEB S Lett (1997) 409, 437-441）、デカボディ（Stone, E., et al, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94）および他のドメイン抗体（Holt, L.J., et al, Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490）を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、二価タンパク質性人工結合分子、例えば、「デュオカリン」としても公知の二量体リポカリンムテインを含み得る。

【0248】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、単一の結合部位Bを有し得る、すなわち、一価であり得る。一価の作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）の例は、一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子またはMHC分子を含むがこれらに限定されない。一価抗体フラグメントの例は、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび二価単鎖Fvフラグメントを含む単鎖Fvフラグメント（scFv）を含むがこれらに限定されない。

【0249】

いくつかの態様において、作用物質は、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えばFabフラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント（scFv）、二価抗体フラグメント、例えばF(ab')₂フラグメントである。いくつかの態様において、作用物質は、関心対象の細胞分子に結合することがわかっている親抗体であるかまたはそれ由来である。細胞表面分子に対する様々な抗体分子またはそのフラグメントが当技術分野で周知であり、そのような様々な抗体の任意のものが、本明細書の方法における作用物質として使用され得る。いくつかの態様において、作用物質は、例えば、上記のように親和性が変化したまたは十分に速いオフレートを示す抗体が生成するよう、親または参照抗体の可変重鎖に1つまたは複数のアミノ酸の置換を含む抗体またはそのフラグメントである。例えば、そのような変異の例は、抗CD4抗体13B8.2の変異の関係で公知であり（例えば、米国特許第7,482,000号、米国特許出願公開番号US2014/0295458または国際特許出願公開W02013/124474を参照のこと）、任意のそのような変異が、別の親または参照抗体において行われ得る。

【0250】

いくつかの局面において、一価であり得る作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）は、例えば、一価の抗体フラグメントまたは一価の人工結合分子（タンパク質性もしくはその他）、例えばリポカリンファミリー（「Anticalin（登録商標）」としても公知）のポリペプチドをベースとしたムテインまたは二価の分子、例えば両方の結合部位が維持されている抗体またはフラグメント、例えばF(ab')₂フラグメントを含む。

【0251】

抗体様機能を有するタンパク質性結合分子の例は、リポカリンファミリーのポリペプチ

10

20

30

40

50

ドをベースとしたムテインを含む（例えば、WO 03/029462、Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903を参照のこと）。通常、リポカリン、例えばビリン結合タンパク質、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン、ヒトアポリポタンパク質Dまたはヒト涙液リポカリンは、特定の標的に結合するよう改変することができる天然のリガンド結合部位を有している。細胞表面分子に特異的に結合する作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）として使用され得る抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子のさらなる例は、いわゆるグロボディ（例えば、国際特許出願公開WO 96/23879を参照のこと）、アンキリンスキャホールド（Mosavi, L.K., et al, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448）または結晶性スキャホールド（例えば、国際特許出願公開WO 01/04144）をベースにしたタンパク質、Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187に記載されるタンパク質、アドネクチン（AdNectin）、テトラネクチンおよびアビマーを含むがこれらに限定されない。一般に、ヒト受容体ドメインのファミリーのエクソンシャッフリングによって進化させた多価アビマータンパク質を含むアビマーは、様々な細胞表面受容体において一つながりの複数のドメインとして発生するいわゆるADドメインを含む（Silverman, J., et al, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561）。通常ヒトフィブロネクチンのドメイン由来であるアドネクチンは典型的に、標的に免疫グロブリン様結合するよう改変することができる3つのループを含む（Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658）。通常各々のヒトホモ三量体タンパク質由来であるテトラネクチンも同様に、典型的にC型レクチンドメイン内に所望の結合のために改変することができるループ領域を含む。いくつかの例においてタンパク質リガンドとして機能し得るペプチドは典型的に、側鎖が炭素原子ではなくアミド窒素に接続されている点でペプチドと相違するオリゴ(N-アルキル)グリシンである。ペプチドは典型的に、プロテアーゼおよび他の修飾酵素に対して耐性を有し、ペプチドよりもずっと高い細胞透過性を有し得る（例えば、Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509を参照のこと）。

【0252】

適当なタンパク質性結合分子のさらなる例は、EGF様ドメイン、Kringledメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANDメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、Kunitz/ウシ膵臓トリプシン阻害ドメイン、テンダミスタット、Kazal型セリンプロテアーゼ阻害ドメイン、三葉（P型）ドメイン、フォン・ヴィレブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、サイログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、Sushiドメイン、Linkドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインもしくは免疫グロブリン様ドメイン（例えば、ドメイン抗体もしくはラクダ重鎖抗体）、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォン・ヴィレブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアダメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カップボディ」（Ill et al. Protein Eng (1997) 10, 949-57）、いわゆる「ミニボディ」（Martin et al, EMBO J (1994) 13, 5303-5309）、ダイアボディ（Holliger et al, PNAS USA (1993) 90, 6444-6448）、いわゆる「ヤヌシス（Janusis）」（Traunecker et al, EMBO J (1991) 10, 3655-3659もしくはTraunecker et al, Int J Cancer (1992) Suppl 7, 51-52）、ナノボディ、マイクロボディ、アフィリン、アフィボディ、ノッチン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、抗体様機能を有する核酸分子は、アプタマーであり得る。一般に、アプタマーは、定義された三次元モチーフに折りたたまれ、特定の標的構造に対して高い親和性を示す。

【0253】

1. 受容体結合物質

いくつかの態様において、作用物質は、受容体結合物質である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、細胞の表面上の分子（例えば、受容体）に結合し、作用物質と分

10

20

30

40

50

子との間の結合は、細胞内でシグナルを誘導または調整することができる。いくつかの例において、細胞表面分子（例えば、受容体）は、シグナル伝達分子である。いくつかのそのような例において、受容体結合物質は、1つまたは複数の細胞によって発現されるシグナル伝達分子に特異的に結合することができる。いくつかの例において、受容体結合物質は、刺激物質であり、刺激物質は、細胞表面分子、例えば受容体への結合により細胞（例えば、T細胞）内でシグナルを誘導することができる任意の作用物質であり得る。

【0254】

いくつかの態様において、シグナルは、免疫刺激性であり得、この例において、受容体結合物質または刺激物質は、細胞（例えば、T細胞）による免疫応答に関与するまたは免疫応答を刺激するシグナルを誘導または調整することができる、例えば、免疫細胞の増殖もしくは増大、免疫細胞の活性化、免疫細胞の分化、サイトカインの分泌、細胞傷害活性または免疫細胞の1つもしくは複数の他の機能的活性を増加させる。いくつかの態様において、シグナルは、阻害性であり得、この例において、受容体結合物質または刺激物質は、細胞（例えば、T細胞）における免疫応答に関与するまたは免疫応答を阻害するシグナルを誘導または調整することができる、例えば、免疫細胞の増殖もしくは増大、免疫細胞の活性化、免疫細胞の分化、サイトカインの分泌、細胞傷害活性または免疫細胞の1つもしくは複数の他の機能的活性を阻害または減少させる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体のアゴニスト、受容体のアンタゴニスト、または受容体のアゴニスト/アンタゴニストの混合物である。

【0255】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質である。いくつかの局面において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、細胞の表面上の、第1の分子、例えば受容体分子に結合する。したがって、いくつかの例において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、シグナルを誘導または調整する。いくつかの局面において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質によるシグナルの誘導または調整は、細胞の活性化、刺激および/または増大（増殖）をもたらす。したがって、いくつかの例において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、細胞に対する一次活性化シグナルを提供し、それによって細胞を活性化させる。いくつかの態様において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、T細胞活性化シグナル1（例えば、T細胞受容体(TCR)関与を介したシグナル)を提供する。

【0256】

いくつかの態様において、提供される方法によって細胞をインキュベートまたは培養する段階は、1つまたは複数の作用物質の存在下において実施または実行される。いくつかの態様において、細胞をインキュベートまたは培養する段階は、例えば上記の、第1の受容体結合物質、および1つまたは複数の第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質の存在下におけるものである。

【0257】

いくつかの局面において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質である。場合によっては、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、細胞表面分子、例えば受容体分子のような、細胞の表面上の分子に結合する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、シグナル、例えば、第2または追加のシグナルを誘導またはモジュレートする。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、第1の分子を通じて送達されるシグナルを増大、減衰、または改変することができる。

【0258】

いくつかの局面において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質によって誘導されるシグナルを増大または増強しうる。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、アクセサリ分子に結合し、ならびに/あるいは細胞においてアクセサリシグナルもしくは第2のシグナルおよび/または追加のシグナルを刺激または誘導することができる。いくつかの局

面において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、共刺激分子に結合し、および/または共刺激シグナルを提供する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、T細胞活性化シグナル2（例えば、共刺激シグナル）を提供する。いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質は、T細胞活性化シグナル3（例えば、サイトカインシグナル、アクセサリーシグナル、生存シグナルおよび/または環境シグナル）を提供する。

【0259】

いくつかの態様において、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる受容体結合物質、例えば刺激物質は、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子、接着分子、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーおよび/またはWnt受容体もしくは共受容体、例えばFrizzled (Fz)受容体ファミリーであることができる、分子、例えば第2の分子に結合する、例えば特異的に結合する。

【0260】

いくつかの態様において、提供された方法によって細胞をインキュベートまたは培養する段階は、3つまたはそれ以上の結合物質のような、3つまたはそれ以上の作用物質の存在下において実施または実行される。いくつかの態様において、細胞をインキュベートまたは培養する段階は、1つまたは複数の追加のシグナルをモジュレートする、1つまたは複数の追加の受容体結合物質、例えば第3の受容体結合物質の存在下におけるものである。例えば、いくつかの態様において、提供された方法によって細胞をインキュベートまたは培養する段階は、少なくとも3つの異なる受容体結合物質、例えば、初代T細胞活性化シグナル、例えばシグナル1（例えば、T細胞受容体(TCR)関与を介したシグナル）を提供する、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質；シグナル2（例えば、共刺激シグナルまたはアクセサリーシグナル）を提供する、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質、ならびにシグナル3（例えば、サイトカインシグナル、生存シグナルおよび/または環境シグナル）を提供する、追加の（例えば第3の）受容体結合物質、例えば追加の刺激物質の存在下において実施または実行される。任意の数の受容体結合物質、例えば刺激物質を、本明細書において記述される方法のいずれかのために任意の組み合わせで選択することができる。

【0261】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば、第1、第2および/または追加の（例えば第3の）受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば細胞の表面上に発現される受容体に特異的に結合する結合物質でありうる。場合によっては、受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片である。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗受容体抗体、抗受容体抗体の二価抗体断片、抗受容体抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片は、F(ab')₂断片、または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。場合によっては、抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキヤホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、またはアビマーでありうる。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。

【0262】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば、第1、第2および/または追加の（例えば第3の）受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体に結合する、例えば特異的に結合する、リガンドでありうる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質は、内因性リガンド、同族リガンド、合成リガンドおよび/またはその一部、バリエーションもしくは修飾型である。例えば、いくつかの態様に

において、受容体結合物質は、サイトカイン受容体に結合するサイトカインである。いくつかの態様において、受容体結合物質は、ケモカイン受容体に結合するケモカインである。いくつかの態様において、受容体結合物質は、サイトカインもしくはケモカインの細胞外ドメインもしくは一部、または細胞表面接着分子に結合する接着分子の細胞外ドメインもしくは一部である。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、それ自体が細胞表面または膜貫通タンパク質である内因性リガンドおよび/または同族リガンドの細胞外ドメインまたはその一部であることができる。

【0263】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば、第1、第2および/または追加の(例えば第3の)受容体結合物質、例えば刺激物質は、B細胞、T細胞またはナチュラルキラー細胞を含むが、これらに限定されない、リンパ球でありうる細胞の表面上の分子に結合する。細胞の実例は、CD40またはCD137を有するB細胞である(両細胞集団は、活性化シグナルを提供する第1の作用物質、例えば4-1BBリガンド;または α CD40抗体分子もしくは α CD137抗体分子(例えば、Zhang et al., 2010, J Immunol, 184:787-795を参照のこと)のみに結合することによって増殖し得る)。B細胞の増大のために使用され得る作用物質(第1または第2のいずれか)の他の実例は、IgG、CD19、CD28またはCD14に結合する作用物質、例えば α CD19、 α IgG、 α CD28もしくは α CD14抗体分子またはその抗原結合部分である。B細胞の増大のための第1または第2の作用物質がtol1様受容体またはインターロイキン、例えばIL-21に対するリガンドを含み得ることも想定されている(例えば、Dienz O, et al. 2009. J. Exp. Med. 206:69を参照のこと)。リポ多糖もまた第1の作用物質として使用され得、本明細書で使用する結合パートナーC1を備えることができることから、B細胞のリポ多糖依存的な活性化も本発明に包含されていることに留意されたい。

【0264】

適当な細胞集団の他の実例は、TCR/CD3への第1の作用物質の結合およびT細胞上のアクセサリー分子、例えばCD28への第2の作用物質の結合により活性化された後に増大されるT細胞集団を含む。この例において、第1の作用物質は、T細胞内のTCR/CD3複合体関連シグナルを刺激し、第2の作用物質は、アクセサリー分子としてのCD28への結合により二次刺激を提供する。T細胞の増大のために使用され得る作用物質はまた、インターロイキン、例えば、IL-2、IL-7、IL-15またはIL-21を含み得る(例えば、Cornish et al. 2006, Blood. 108(2):600-8、Bazdar and Sieg, 2007, Journal of Virology, 2007, 81(22):12670-12674、Battalia et al, 2013, Immunology, 139(1):109-120を参照のこと)。T細胞の増大のために使用され得る作用物質の他の実例は、CD8、CD45またはCD90に結合する作用物質、例えば α CD8、 α CD45または α CD90抗体である。T細胞集団の実例は、抗原特異的T細胞、Tヘルパー細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞(メモリーT細胞の実例は、CD62L⁺CD8⁺特異的セントラルメモリーT細胞である)または調節性T細胞(Tregの実例は、CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ Treg細胞である)を含む。

【0265】

適当な細胞集団の別の実例は、例えばCD16またはCD56に結合する作用物質、例えば α CD16または α CD56抗体、を用いて増大され得る、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)を含む。そのような α CD16抗体の実例は、SEQ ID NO:48に示されるVH配列およびSEQ ID NO:49に示されるVL配列を有する抗体3G8である(例えば、Hoshino et al, Blood. 1991 Dec 15;78(12):3232-40を参照のこと)。NK細胞の増大のために使用され得る別の作用物質は、IL-15であり得る(例えば、Vitale et al. 2002. The Anatomical Record. 266:87-92を参照のこと)。適当な細胞集団のさらに別の実例は、例えばCD14に結合する作用物質、例えば α CD14抗体分子、を用いて増大され得る、単球を含む。

【0266】

いくつかの局面において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、標的細胞の表面上に発現される分子を特異的に標的とし、その分子はTCRまたはキメラ抗原受容体である。例えば、標的細胞の表面上に発現される分子は、T細胞またはB細胞抗原受容体複合体、CD3鎖、CD3ゼータ、T細胞受容体もしくはB細胞受容体の抗原結合部分、またはキメラ抗原受容

10

20

30

40

50

体から選択される。いくつかの例において、受容体結合物質は、ペプチド：MHCクラスI複合体を標的とする。

【0267】

いくつかの態様において、刺激物質は、標的細胞の表面上に発現される分子のHisタグ付加細胞外ドメインに結合する。いくつかの例において、刺激物質は、ニッケル付加tris NTA (His-STREPPERまたはHis/Strep-tag (登録商標) IIアダプターとも呼ばれる) にコンジュゲートされたペプチド配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) を含む。いくつかの態様において、Hisタグ付加された標的細胞の表面上に発現される分子は、CD19である。

【0268】

いくつかの局面において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、組換え受容体、例えばCARの抗体部分に特異的に結合する。いくつかの例において、組換え受容体の抗体部分は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域ならびに／またはCH1/CLおよび／もしくはFc領域を含む。いくつかの態様において、定常領域または一部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のそれらである。いくつかの例において、試薬は、IgG4スパーサーを認識するαIgGを有する。

【0269】

いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の受容体結合物質は、同じ試薬(例えば多量体形成試薬)に、例えば同じオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬などに可逆的に結合する。いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の受容体結合物質、例えば、第1の受容体結合物質、第2の受容体結合物質および／または1つもしくはそれ以上の追加の(例えば第3の)受容体結合物質は、2つまたはそれ以上の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を介して同じ試薬(例えば多量体形成試薬)に可逆的に結合する。

【0270】

いくつかの態様において、2つまたはそれ以上の受容体結合物質は、2つまたはそれ以上の異なるオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬のような、2つまたはそれ以上の異なる試薬(例えば多量体形成試薬)に可逆的に結合する。いくつかのそのような態様において、少なくとも1つの受容体結合物質、例えば第1の受容体結合物質は、受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を介して第1の試薬(例えば第1の多量体形成試薬)に可逆的に結合し、かつ少なくとも1つまたは複数の追加の受容体結合物質(例えば第2の受容体結合物質または第3の受容体結合物質)は、受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を介して第2の試薬(例えば第2の多量体形成試薬)に可逆的に結合する。

【0271】

a. T細胞活性化を刺激する受容体結合物質

いくつかの態様において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、細胞、例えばT細胞内でTCR/CD3複合体関連シグナル(例えば、TCRの関与を介したシグナル1)を刺激し得る。いくつかの局面において、第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、CD3に特異的に結合する結合物質であり得る。いくつかの例において、CD3に特異的に結合する第1の受容体結合物質、例えば第1の刺激物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択され得る。二価抗体フラグメントは、F(ab')₂フラグメントまたは二価単鎖Fvフラグメントであり得、一価抗体フラグメントは、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび単鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択され得る。いくつかの例において、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子は、アダプター、リポカリンファミリーのポリペプチドをベースとしたムテイン、グルボディ、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチンまたはアビマーであり得る。

【0272】

いくつかの態様において、抗CD3 Fabフラグメントは、ハイブリドーマ細胞株OKT3（ATC C（登録商標）CRL-8001（商標）；米国特許第4,361,549号も参照のこと）により産生されるCD3結合モノクローナル抗体由来であり得る。抗CD3抗体OKT3の重鎖の可変ドメインおよび軽鎖の可変ドメインは、Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)に記載されており、それぞれ、SEQ ID NO:31および32に示されるアミノ酸配列を含む。

【0273】

b. 共刺激シグナルおよび/またはアクセサリーシグナルを刺激する受容体結合物質

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば、第2の受容体結合物質、例えば刺激物質は、分子を発現する細胞、例えばT細胞またはB細胞に対して、共刺激シグナルまたはアクセサリーシグナルを提供する分子に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、分子を発現する細胞、例えばT細胞に対して、T細胞活性化シグナル2、例えば共刺激シグナルを刺激または活性化する分子に結合する。いくつかの態様において、受容体結合物質は、分子を発現する細胞、例えばT細胞に対してアクセサリーシグナルを提供する。

【0274】

本明細書において提供される態様のいずれかにおいて、受容体結合物質、例えば、第2の受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば、細胞の表面上に発現される受容体に特異的に結合する結合物質でありうる。

【0275】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えば、作用物質の結合時に、T細胞活性化シグナル2、例えば共刺激シグナルを刺激または活性化する細胞表面分子に結合する抗体またはその抗原結合断片である。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗受容体抗体、抗受容体抗体の二価抗体断片、抗受容体抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片は、F(ab')₂断片、または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。場合によっては、抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキヤホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、またはアビマーでありうる。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。

【0276】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば、作用物質の結合時に、T細胞活性化シグナル2、例えば共刺激シグナルを刺激または活性化する細胞表面分子に結合する、例えば特異的に結合するリガンドでありうる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質は、内因性リガンド、同族リガンド、合成リガンドおよび/またはその一部、バリエーションもしくは修飾型である。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、内因性リガンドおよび/または同族リガンドの、細胞外ドメインまたはその一部であることができる。

【0277】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30LおよびLIGHTのいずれか1つまたは複数に結合することができる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30LおよびLIGHTのいずれか1つまたは複数に対する抗体、二価抗体(例えばF(ab')₂断片)もしくは二価一本鎖Fv断片)、一価抗体(例えばFab断片、Fv断片、もしくは一本鎖Fv断片(scFv))またはリガンドであることができ、ここでそのよう

な作用物質は、受容体結合物質、例えば刺激物質の分子への結合時に細胞におけるシグナルを誘導またはモデリングすることができる。

【0278】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30LおよびLIGHTのいずれか1つまたは複数に対するリガンドであることができ、ここでそのような作用物質は、受容体結合物質、例えば刺激物質の分子への結合時に細胞におけるシグナルを誘導またはモデリングすることができる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、内因性リガンドおよび/または同族リガンドの、細胞外ドメインまたはその一部であることができる。例えば、いくつかの態様において、受容体結合物質は、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、ICOS-L、PD-L1、OX40L、CD27、4-1BB (CD137)および/もしくはCD30の細胞外ドメインもしくはその一部であるか、またはそれを含む。

10

【0279】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD3、CD137またはCD40以外の標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる。場合によっては、CD28、CD3、CD137またはCD40以外の標的細胞の表面上の分子への受容体結合物質、例えば刺激物質の結合は、標的細胞におけるシグナルを誘導もしくはモジュレートし、および/または標的細胞の機能を改変し、それによって培養標的細胞が生成される。

【0280】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバー、例えば、TNF受容体スーパーファミリー、および/またはWnt受容体もしくは共受容体、例えばFrizzled (Fz)受容体ファミリーのメンバーのいずれか1つまたは複数に結合することができる。

20

【0281】

いくつかの態様において、細胞上の分子は、腫瘍壊死因子受容体1 (CD120a)、腫瘍壊死因子受容体2 (CD120b)、リンホトキシンベータ受容体(CD18)、OX40 (CD134)、CD40 (Bp50)、Fas受容体(Apo-1, CD95)、デコイ受容体3 (TR6, M68)、CD27 (S152, Tp55)、CD30 (Ki-1)、4-1BB (CD137)、細胞死受容体4 (TRAILR1, Apo-2, CD261)、細胞死受容体5 (TRAILR2, CD262)、デコイ受容体1 (TRAILR3, LIT, TRID, CD263)、デコイ受容体2 (TRAILR4, TRUNDD, CD264)、RANK (CD265)、オステオプロテゲリン(OCIF, TR1)、TWEAK受容体(Fn14, CD266)、TACI (IGAD2, CD267)、BAFF受容体(CD268)、ヘルペスウイルスエントリメディエータ(ATAR, TR2, CD270)、神経成長因子受容体(p75NTR, CD271)、B細胞成熟抗原(TNFRSF13A, CD269)、グルココルチコイド誘発TNFR関連(AITR, CD357)、TROY (TAJ, TRADE)、細胞死受容体6 (CD358)、細胞死受容体3 (Apo-3, TRAMP, LARD, WS-1)またはエクトジスプラシンA2受容体(XEDAR)のような、TNF受容体スーパーファミリーのメンバーである。

30

【0282】

場合によっては、TNF受容体スーパーファミリータンパク質に特異的に結合する受容体結合物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。いくつかの態様において、TNF受容体スーパーファミリータンパク質に特異的に結合する受容体結合物質は、受容体、および/または細胞外ドメインもしくはその一部に結合する、例えば特異的に結合する、リガンドでありうる。いくつかの態様において、リガンドは、TNF α 、リンホトキシンベータ(TNF-C)、OX40L、CD154、FasL、FasL、LIGHT、TL1A、CD70、Siva、CD153、4-1BBリガンド、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、BAFF、LIGHT、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、BAFF、GITRリガンド、TL1AもしくはEDA-A2、または膜貫通タンパク質のいずれかの細胞外ドメインもしくはその一部であるか、またはそれを含む。

40

【0283】

いくつかの態様において、細胞上の分子は、Wnt受容体または共受容体、Frizzled (Fz)ファミリー受容体、リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)-5/6、受容体チロシンキナーゼ(RTK)、および受容体関連オーファン受容体2 (ROR2)のような、受容体である。いくつかの態様において、細胞上の分子は、例えば、Frizzled-1 (FZD1)、Frizzled-2 (FZD

50

2)、Frizzled-3 (FZD3)、Frizzled-4 (FZD4)、Frizzled-5 (FZD5)、Frizzled-6 (FZD6)、Frizzled-7 (FZD7)、Frizzled-8 (FZD8)、Frizzled-9 (FZD9)またはFrizzled-10 (FZD10)である。

【0284】

場合によっては、Wnt受容体または共受容体に特異的に結合する受容体結合物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。いくつかの態様において、Wnt受容体または共受容体に特異的に結合する受容体結合物質は、受容体に結合する、例えば特異的に結合する、リガンドでありうる。いくつかの態様において、リガンドは、例えば、WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11もしくはWNT16であるか、またはそれを含む。

10

【0285】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMのいずれか1つまたは複数に結合することができる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMのいずれか1つまたは複数に対する抗体、二価抗体(例えばF(ab')₂断片もしくは二価一本鎖Fv断片)、一価抗体(例えばFab断片、Fv断片、もしくは一本鎖Fv断片(scFv))またはリガンドであることができ、ここでそのような作用物質は、受容体結合物質、例えば刺激物質の分子への結合時に細胞におけるシグナルを誘導またはモデリングすることができる。

20

【0286】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28、4-1BB (CD137)、CD40、CD40L、T細胞の活性化のためのリンカー(LAT)、CD27、OX40 (CD134)およびヘルペスウイルスエントリメディエータ(herpesvirus entry mediator; HVEM)のいずれか1つまたは複数に対するリンカーであることができ、ここでそのような作用物質は、受容体結合物質、例えば刺激物質の分子への結合時に細胞におけるシグナルを誘導またはモデリングすることができる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、内因性リガンドおよび/または同族リガンドの、細胞外ドメインまたはその一部であることができる。例えば、いくつかの態様において、受容体結合物質は、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、4-1BBL、CD40、CD40L、CD27L (CD70)および/もしくはOX40Lの細胞外ドメインもしくはその一部であるか、またはそれを含む。

30

【0287】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD28であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、CD28に特異的に結合する。

【0288】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD28であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る)受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD28に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD28に特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る)受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗CD28抗体、抗CD28抗体の二価抗体フラグメント、抗CD28抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD28結合分子からなる群より選択され得る。二価抗体フラグメントは、F(ab')₂フラグメントまたは二価単鎖Fvフラグメントであり得、一価抗体フラグメントは、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび単鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択され得る。抗体様結合特性を有するタンパク質性CD28結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドをベースとしたムテイン、グルボディ、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチンまたはアビマーであり得る。

40

【0289】

いくつかの態様において、抗CD28 Fabフラグメントは、その重鎖および軽鎖がそれぞれ

50

SEQ ID NO:33および34を含む、抗体CD28.3 (GenBankアクセッション番号AF451974.1の下で合成単鎖Fvコンストラクトとして寄託されている; Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570も参照のこと) 由来であり得る。

【0290】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞またはB細胞上の分子は、CD137であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD137に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD137に特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体フラグメント、抗CD137抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD137結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、抗CD137抗体は、Taraban et al. Eur J Immunol. 2002 Dec;32(12):3617-27に記載される、IgG2aであるLOB12、またはIgG1であるLOB12.3であり得る。例えば、US6569997、US6303121、Mittler et al. Immunol Res. 2004;29(1-3):197-208も参照のこと。

10

【0291】

いくつかの態様において、細胞、例えばB細胞上の分子は、CD40であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD40に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD40に特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質は、抗CD40抗体、抗CD40抗体の二価抗体フラグメント、抗CD40抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD40結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のものに由来しうる。例えば、抗CD40抗体はキメラモノクローナル抗ヒトCD40抗体テネリキシマブおよび抗ヒトCD40 (Affymetrixカタログ番号14-0409-80) であることができ、または、例えばUS 2002/0142358、US 2007/0077242、WO 2001/083755、Zhang et al., 2010, J Immunol, 184:787-795に記載されたいずれかであることができる。

20

【0292】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD40L (CD154) であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD40Lに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD40Lに特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗CD40L抗体、抗CD40L抗体の二価抗体フラグメント、抗CD40L抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD40L結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、抗CD40L抗体は、いくつかの局面において、Blair et al. JEM vol. 191 no. 4 651-660に記載される、Hu5C8であり得る。例えば、WO1999061065、US20010026932、US7547438、WO2001056603も参照のこと。

30

【0293】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、誘導性T細胞共刺激因子 (ICOS) であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、ICOSに特異的に結合する。いくつかの局面において、ICOSに特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の二価抗体フラグメント、抗ICOS抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性ICOS結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、US20080279851およびDeng et al. Hybrid Hybridomics. 2004 Jun;23(3):176-82を参照のこと。

40

【0294】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、Linker for Activation of

50

T cells (LAT) であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、LATに特異的に結合する。いくつかの局面において、LATに特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗LAT抗体、抗LAT抗体の二価抗体フラグメント、抗LAT抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性LAT結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、Zhang et al., Cell. 1998 Jan 9;92(1):83-92およびFacchetti et al., Am J Pathol. 1999 Apr; 154(4): 1037-1046を参照のこと。

【0295】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD27であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、CD27に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD27に特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗CD27抗体、抗CD27抗体の二価抗体フラグメント、抗CD27抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD27結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、WO2008051424、US 9023999、US 8481029、US 9169325、US 9102737、US 2016/0185870、およびHe et al., J Immunol. 2013 Oct 15;191(8):4174-83を参照のこと。

【0296】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、OX40 (CD134) であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、OX40に特異的に結合する。いくつかの局面において、OX40に特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗OX40抗体、抗OX40抗体の二価抗体フラグメント、抗OX40抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性OX40結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、US 2010/0196359、US 2015/0307617、WO 2015/153513、WO203038191、およびMelero et al. Clin Cancer Res. 2013 Mar 1;19(5):1044-53を参照のこと。

【0297】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、ヘルペスウイルスエントリメディエータ (HVEM) であり得、(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、HVEMに特異的に結合する。いくつかの局面において、HVEMに特異的に結合する(例えば、第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であり得る) 受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の二価抗体フラグメント、抗HVEM抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性HVEM結合分子からなる群より選択され得る。抗体または抗原結合フラグメントは、当技術分野で公知の任意のもの由来であり得る。例えば、WO2006054961、WO2007001459、Park et al. Cancer Immunol Immunother. 2012 Feb;61(2):203-14を参照のこと。

【0298】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD90であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、CD90に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD90に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体断片、抗CD90抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CD90結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、抗ヒトCD90抗体クローン5E10 (Stemcell Technolog

ies, カタログ番号60045またはBD Biosciences カタログ番号550402)および抗CD90抗体G7 (Biolegend, カタログ番号105201)を参照されたい。

【0299】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD95であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、CD95に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD95に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体断片、抗CD95抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CD95結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗CD95抗体は、モノクローナルマウス抗ヒトCD95 CH11 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)であることができ、または例えば、WO 2015/197874、US 9309320、US 7935339およびPaulsen et al. Cell Death & Differentiation 18.4 (2011): 619-631に記述されているいずれかのような、抗CD95 mAb 7C11もしくは抗APO-1であることができる。

10

【0300】

c. 追加のシグナルを提供する受容体結合物質

いくつかの態様において、第2または追加の受容体結合物質でありうる受容体結合物質に対する、細胞、例えばT細胞上の分子は、作用物質の結合時に、サイトカインシグナル、ケモカインシグナル、細胞接着シグナル、T細胞活性化シグナル3または追加のシグナル、例えば環境シグナルを刺激または活性化する細胞表面分子に結合する。いくつかの態様において、第2または追加の受容体結合物質でありうる受容体結合物質が特異的に結合する細胞、例えばT細胞上の分子は、サイトカイン受容体またはケモカイン受容体である。場合によっては、受容体結合物質、例えば追加の受容体結合物質は、接着分子であるか、またはそれを含み、サイトカイン産生、ケモカイン産生、接着分子の発現を誘導する因子であり、ならびに/あるいはアクセサリシグナルおよび/または追加のシグナル、例えば環境シグナルを刺激および/またはモデュレートすることに関与している。

20

【0301】

本明細書において提供される態様のいずれかにおいて、受容体結合物質、例えば、第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば細胞の表面上に発現される受容体に特異的に結合する結合物質でありうる。

30

【0302】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えば、作用物質の結合時に、サイトカインシグナル、ケモカインシグナル、細胞接着シグナル、T細胞活性化シグナル3または追加のシグナル、例えば環境シグナルを刺激または活性化する細胞表面分子に結合する抗体またはその抗原結合断片である。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗受容体抗体、抗受容体抗体の二価抗体断片、抗受容体抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片は、F(ab')₂断片、または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。場合によっては、抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキヤホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、またはアビマーでありうる。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。

40

【0303】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば、作用物質の結合時に、サイトカインシグナル、ケモカインシグナル、細胞接着シグナル、T細胞

50

胞活性化シグナル3または追加のシグナル、例えば環境シグナルを刺激または活性化する細胞表面分子に結合する、例えば特異的に結合するリガンドでありうる。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質は、内因性リガンド、同族リガンド、合成リガンドおよび/またはその一部、バリエーションもしくは修飾型である。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、内因性リガンドおよび/または同族リガンドの、細胞外ドメインまたはその一部であることができる。

【0304】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、サイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、サイトカイン受容体のリガンド、例えばサイトカインまたはその一部であるか、またはそれを含む。

10

【0305】

例示的なサイトカイン受容体としては、IL-2R、IL-7R、IL-21R、CD132 (IL受容体共通ガンマ鎖)、IL-1R、IL-15R、IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-17R、TNFR1およびTNFR2が挙げられるが、これらに限定されることはない。例示的なリガンド、例えば、サイトカインとしては、IL-2、IL-7、IL-21、IL-1、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-4、IL-10、I型インターフェロン(例えば、IFN α および/またはIFN β)、IL-12、IL-17、IL-9およびTNF、ならびにその生物学的に活性な断片が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

【0306】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、サイトカイン受容体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。場合によっては、サイトカイン受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、抗(サイトカイン受容体)抗体、抗(サイトカイン受容体)抗体の二価抗体断片、抗(サイトカイン受容体)抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性サイトカイン受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片はF(ab')₂断片または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。

30

【0307】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば追加の受容体結合物質は、ケモカイン受容体に特異的に結合するリガンドであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、ケモカイン受容体のリガンド、例えばケモカインまたはその一部であるか、またはそれを含む。

【0308】

例示的なケモカイン受容体は、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3およびCXCR4を含むが、これらに限定されることはない。例示的なリガンド、例えばケモカインは、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21およびCCL25またはその生物学的に活性な断片を含むが、これらに限定されることはない。

40

【0309】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、ケモカイン受容体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。場合によっては、ケモカイン受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、抗(ケモカイン受容体)抗体、抗(ケモカイン受容体)抗体の二価抗体断片、抗(ケモカイン受容体)抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性ケモカイン受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片はF(ab')₂断片または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。

【0310】

50

場合によっては、サイトカインを誘導する接着分子または因子に特異的に結合する受容体結合物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。いくつかの態様において、サイトカインを誘導する接着分子または因子に特異的に結合する受容体結合物質は、受容体に結合する、例えば特異的に結合する、リガンドでありうる。いくつかの態様において、受容体結合物質は、接着分子および/または受容体の、内因性リガンド、同族リガンド、合成リガンドおよび/またはその一部、そのバリエーションもしくは修飾型である。いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質は、それ自体が細胞表面または膜貫通タンパク質である内因性リガンドおよび/または同族リガンドの細胞外ドメインまたはその一部であることができる。

【0311】

いくつかの例では、細胞上の分子、例えば接着分子は、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1; それぞれSEQ ID NO: 71および72に記載された完全長アルファおよびベータ鎖配列)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン; SEQ ID NO:73に記載された完全長配列)、CD29/CD49d (VLA-4; SEQ ID NO:75に記載された完全長配列)、CD106 (VCAM-1; SEQ ID NO:74に記載された完全長配列)またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、接着分子、例えばCD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、CD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)またはその生物学的に活性な断片に結合する、例えば特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの態様において、受容体結合物質は、接着分子、例えばCD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクチン)、CD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)に結合する、例えば特異的に結合するリガンドまたはその一部である。そのような受容体結合物質は、接着分子の内因性リガンドおよび/または同族リガンドの細胞外ドメイン(ECD)またはその一部であるか、またはそれを含む作用物質を含む。いくつかの態様において、受容体結合物質は、接着分子の細胞外ドメインまたはその一部であり、1つまたは複数の細胞の表面上の接着分子に結合することができる。そのような受容体結合物質の例示的なものとしては、LFA-1 α の細胞外ドメイン(SEQ ID NO:77に記載されたECD); LFA-1 β の細胞外ドメイン(SEQ ID NO:78に記載されたECD); L-セレクチンの細胞外ドメイン(SEQ ID NO:79に記載されたECD); VCAM-1の細胞外ドメイン(SEQ ID NO:80に記載されたECD); およびVLA-4の細胞外ドメイン(SEQ ID NO:81に記載されたECD)、またはその任意の部分が挙げられる。

【0312】

いくつかの態様において、サイトカイン産生、ケモカイン産生および/または接着分子の発現を誘導する因子は、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体ガンマ(RORガンマ)またはRORアルファのような核因子であるか、またはそれを含む。

【0313】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、サイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであるか、またはそれを含む。

【0314】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-2Rであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-2Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-2Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IL-2R抗体、抗IL-2R抗体の二価抗体断片、抗IL-2R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-2R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、EP 2425250、US 2011/0053209、WO 2009/145831、US 2010/0055098、およびVolk et al., Clin Exp Immunol. 1989 Apr; 76(1): 121-125に記述されているいずれかでありうる。

【0315】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-7R (CD127)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、IL-7Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-7Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗IL-7R抗体、抗IL-7R抗体の二価抗体断片、抗IL-7R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-7R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、WO 2016/059512、WO 2015/189302、Lee et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 31;109(31):12674-9、およびChung et al., Blood (2007) 110(8):2803-2810に記述されているいずれかでありうる。

10

【0316】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-21R (CD360)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、IL-21Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-21Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗IL-21R抗体、抗IL-21R抗体の二価抗体断片、抗IL-21R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-21R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、US 2006/0159655、US 2006/0039902、US 2003/0108549、およびGuo et al., J Transl Med. 2010; 8: 50に記述されているいずれかでありうる。

20

【0317】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL受容体共通ガンマ鎖(γc ; またはCD132)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、共通ガンマ鎖に特異的に結合する。インターロイキン-2受容体サブユニットガンマまたはIL-2RGとしても知られている共通ガンマ鎖(γc ; またはCD132)は、インターロイキン受容体: IL-2R、IL-4R、IL-7R、IL-9R、IL-15RおよびIL-21Rの受容体複合体に共通するサイトカイン受容体サブユニットである。いくつかの局面において、共通ガンマ鎖に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗 γc 抗体または抗CD132抗体、抗 γc 抗体または抗CD132抗体の二価抗体断片、抗 γc 抗体または抗CD132抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性共通ガンマ鎖結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、抗 γc 抗体もしくは抗CD132抗体TUGh4 (AB_2123585 (BioLegendカタログ番号338607)またはAB_2123584 (BioLegendカタログ番号338608))、Itano et al. 1996. J. Exp. Med. 178:389、Kondo et al. 1993. Science 262:1874、Hodge et al. 2012. Blood. 120:3774、Matsubara et al. 2014. Sci Rep. 4:5043およびMassoud et al. 2015. PNAS. 112: 11030-11035、Perez-Simon, Blood 2015 125:424-426に記述されているいずれかでありうる。

30

40

【0318】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-1R1またはIL-1R2のような、IL-1R (CD121)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、IL-1Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-1Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗IL-1R抗体、抗IL-1R抗体の二価抗体断片、抗IL-1R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-1R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、

50

場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、ヒトIL-1R1抗体(R&D Systemsカタログ番号AF269)でありうる。

【0319】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-15R (CD215)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、IL-15Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-15Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは第2の受容体結合物質、例えば第2の刺激物質であることができる)は、抗IL-15R抗体、抗IL-15R抗体の二価抗体断片、抗IL-15R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-15R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、US 2004/0185048、US 6013480に記述されているいずれかでありえるか、または抗ヒトIL-15R抗体eBioJM7A4 (Affymetrixカタログ番号12-7159-41)でありえる。

【0320】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、インターフェロンガンマ受容体(IFN γ R; CD119)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IFN γ Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IFN γ Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IFN γ R抗体、抗IFN γ R抗体の二価抗体断片、抗IFN γ R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IFN γ R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、抗ヒトCD119 (IFNガンマ受容体1)抗体GIR 208 (eBioscienceカタログ番号13-1199-80)および抗ヒトIFNガンマ受容体抗体ab25448 (Abcamカタログ番号ab25448)でありうる。

【0321】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、例えば、TNFR1 (CD120a)およびTNFR2 (CD120b)を含む、腫瘍壊死因子アルファ受容体(TNF α R)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、TNF α Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、TNF α Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗TNF α R抗体、抗TNF α R抗体の二価抗体断片、抗TNF α R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性TNF α R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、WO 2012/087928、WO 2010/120374に記述されているいずれかならびに抗ヒトIFNガンマ受容体抗体ab19139 (Abcamカタログ番号ab19139)およびab74315 (Abcamカタログ番号ab74315)でありうる。

【0322】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-4Rであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-4Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-4Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IL-4R抗体、抗IL-4R抗体の二価抗体断片、抗IL-4R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-4R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、WO2005047331に記述されているいずれかでありうる。

【0323】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-10Rであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-10Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-10Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IL-10R抗体、抗IL-10R抗体の二価抗体断片、抗IL-10R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-10R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、US 7553932、US 8071374、Castro et al., J Exp Med. 2000 Nov 20;192(10):1529-34に記述されているいずれかまたは抗IL-10R抗体9D7 (ThermoFisherカタログ番号06-1067)でありうる。

10

【0324】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、インターフェロンI型受容体、例えば、IFNAR1およびIFNAR2を含む、IFN α 受容体(IFNAR)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IFNARに特異的に結合する。いくつかの局面において、IFNARに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IFNAR抗体、抗IFNAR抗体の二価抗体断片、抗IFNAR抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IFNAR結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、例えば、US 2013/0254912、US 7662381、US 8460668、Baccala et al., J. Immunol. 2012, 189(12):5976-5984に記述されているいずれかおよび抗IFNAR2抗体クローンMMHAR-2 (PBL Sciencesカタログ番号21385-1)でありうる。

20

【0325】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-12Rであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-12Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-12Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IL-12R抗体、抗IL-12R抗体の二価抗体断片、抗IL-12R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-12R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、EP0638644またはUS5853721に記述されているいずれかでありうる。

30

【0326】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、IL-17R (CD217)であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-17Rに特異的に結合する。いくつかの局面において、IL-17Rに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗IL-17R抗体、抗IL-17R抗体の二価抗体断片、抗IL-17R抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性IL-17R結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、場合によっては、抗体または抗原結合断片は、W02008054603、EP2487188、Papp et al., J Invest Dermatol. 2012 Oct;132(10):2466-9、Moseley et al., 2003. Cytokine Growth Factor Rev. 14:155、Rong et al., 2009. Cell. Res. 19:208、Toy et al., 2006. J. Immunol. 177:36に記述されているいずれか、または抗ヒトCD217抗体クローンW15177A (Biolegend)でありうる。

40

【0327】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容

50

体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-2リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-2リガンドは、SEQ ID NO: 50に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 50に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

10

【0328】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-7リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-7リガンドは、SEQ ID NO: 51に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 51に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

20

【0329】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-21リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-21リガンドは、SEQ ID NO: 52に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 52に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

30

【0330】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-1リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-1リガンドは、SEQ ID NO: 53および/もしくは54 (それぞれIL-1 α もしくはIL-1 β)に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 53および/もしくは54 (それぞれIL-1 α もしくはIL-1 β)に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレ

40

50

ートする機能的活性を保持している。

【0331】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-15リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-15リガンドは、SEQ ID NO: 55に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 55に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

10

【0332】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-9リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-9リガンドは、SEQ ID NO: 81に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 81に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

20

【0333】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IFN γ リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IFN γ リガンドは、SEQ ID NO: 56に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 56に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

30

40

【0334】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、TNF α リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、TNF α リガンドは、SEQ ID NO: 57に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 57に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部

50

分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0335】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-4リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-4リガンドは、SEQ ID NO: 58に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 58に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

10

【0336】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-10リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-10リガンドは、SEQ ID NO: 59に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 59に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

20

【0337】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、I型インターフェロン、例えばIFN α 、IFN β 、IFN κ 、IFN δ 、IFN ϵ 、IFN τ 、IFN ω 、およびIFN ζ (リミチンとしても公知)またはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、I型インターフェロンはIFN- α またはIFN- β であり、これはSEQ ID NO: 60もしくは61 (それぞれIFN- α 2もしくはIFN- β 1)に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 60もしくは61に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

30

40

【0338】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-12リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-12リガンドは、SEQ ID NO: 62および/もしくは63 (それぞれIL-12 α もしくはIL-12 β)に記載される

50

アミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 62および/もしくは63 (それぞれIL-12 α もしくはIL-12 β)に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0339】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、IL-17リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、IL-17リガンドは、SEQ ID NO: 64に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 64に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0340】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば第2または追加の受容体結合物質は、ケモカイン受容体に特異的に結合するリガンドであるか、またはそれを含む。

【0341】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CXCR3であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CXCR3に特異的に結合する。いくつかの局面において、CXCR3に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗CXCR3抗体、抗CXCR3抗体の二価抗体断片、抗CXCR3抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CXCR3結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、W02003024404に記載されているいずれかであることができる。

【0342】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CCR7であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CCR7に特異的に結合する。いくつかの局面において、CCR7に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗CCR7抗体、抗CCR7抗体の二価抗体断片、抗CCR7抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CCR7結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、US6153441に記載されているいずれかであることができる。

【0343】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CXCR1であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CXCR1に特異的に結合する。いくつかの局面において、CXCR1に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗CXCR1抗体、抗CXCR1抗体の二価抗体

断片、抗CXCR1抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CXCR1結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、抗CXCR1抗体[42705.111] (Abcam; ab10400)であることができる。

【0344】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CXCR4であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CXCR4に特異的に結合する。いくつかの局面において、CXCR4に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗CXCR4抗体、抗CXCR4抗体の二価抗体断片、抗CXCR4抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CXCR4結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、WO2003024404に記述されているいずれかであることができる。

【0345】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CXCL9リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、CXCL9リガンドは、SEQ ID NO: 65に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 65に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0346】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CXCL10リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、CXCL10リガンドは、SEQ ID NO: 66に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 66に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0347】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CCL19リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、CCL19リガンドは、SEQ ID NO: 67に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 67に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部

分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

【0348】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CCL21リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、CCL21リガンドは、SEQ ID NO: 68に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 68に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

10

【0349】

いくつかの態様において、受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CCL25リガンドまたはその生物学的に活性な部分のような、細胞内でシグナルを誘導することができる刺激受容体または他の受容体のリガンドを含むことができる。いくつかの局面において、CCL25リガンドは、SEQ ID NO: 69に記載されるアミノ酸配列を有するか、またはSEQ ID NO: 69に記載される配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を示すそのバリエーションであるか、またはその生物学的に活性な部分であり、ここで該バリエーションまたはその生物学的に活性な部分は、受容体に結合する活性および/または受容体に対する1つもしくは複数のシグナルをモジュレートする機能的活性を保持している。

20

【0350】

場合によっては、受容体結合物質、例えば追加の受容体結合物質は、接着分子であるか、もしくはそれを含み、またはサイトカイン産生、ケモカイン産生、接着分子の発現を誘導する因子であり、ならびに/あるいはアクセサリシグナルおよび/もしくは追加のシグナルを刺激および/もしくはモジュレートすることに関与している。

30

【0351】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、CD62Lであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、CD62Lに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD62Lに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗CD62L抗体、抗CD62L抗体の二価抗体断片、抗CD62L抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性CD62L結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれか、例えば、抗体DREG56 (例えばATCC HB300)に由来することができる; 例えば、Stemberger et al. 2012 PLoS One. 2012;7(4):e35798を参照されたい。

40

【0352】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、ROR γ tであり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、ROR γ tに特異的に結合する。いくつかの局面において、ROR γ tに特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗ROR γ t抗体、抗ROR γ t抗体の二価

50

抗体断片、抗ROR γ t抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性ROR γ t結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、いくつかの局面において、抗体または抗原結合断片は、CA2572334に記述されているいずれかであることができる。

【0353】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、ROR α であり得、かつ受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、ROR α に特異的に結合する。いくつかの局面において、ROR α に特異的に結合する受容体結合物質、例えば刺激物質(例えばこれは追加の受容体結合物質、例えば追加の刺激物質であることができる)は、抗ROR α 抗体、抗ROR α 抗体の二価抗体断片、抗ROR α 抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性ROR α 結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合断片は、当技術分野において公知のいずれかに由来することができる。例えば、抗ROR α 抗体はROR α 抗体H-65 (Santa Cruz Biotechnologyカタログ番号sc-28612)である。

【0354】

2. 選択物質

いくつかの態様において、作用物質は選択物質である。いくつかの態様において、選択物質は、細胞表面分子のような、細胞の表面上の分子に結合する。場合によっては、細胞表面分子は選択マーカーである。そのような場合には、選択物質は、1つまたは複数の細胞によって発現される選択マーカーに特異的に結合することができる。いくつかの態様において、試薬に可逆的に結合する選択物質を用いて、細胞の選択または単離を容易にすることができる。

【0355】

本明細書において提供される態様のいずれかにおいて、受容体結合物質、例えば、第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、受容体、例えば細胞の表面上に発現される受容体に特異的に結合する結合物質でありうる。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗受容体抗体、抗受容体抗体の二価抗体断片、抗受容体抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体断片は、F(ab')₂断片、または二価一本鎖Fv断片でありうるが、一価抗体断片は、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片(scFv)からなる群より選択されうる。場合によっては、抗体様の結合特性を有するタンパク質性受容体結合分子は、アダマール、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤホールドをベースにしたタンパク質、結晶性スキヤホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、またはアビマーでありうる。場合によっては、受容体に特異的に結合する受容体結合物質、例えば第1、第2および/または追加の受容体結合物質、例えば刺激物質は、抗体またはその抗原結合断片、例えばFab断片である。

【0356】

いくつかの局面において、細胞表面分子、例えば選択マーカーは、所望の細胞集団またはサブ集団、例えば、血液細胞、例えばリンパ球(例えば、T細胞、Tヘルパー細胞、例えばCD4⁺ Tヘルパー細胞、B細胞もしくはナチュラルキラー細胞)、単球または幹細胞、例えばCD34陽性末梢幹細胞もしくはNanogもしくはOct-4発現幹細胞、の集団またはサブ集団を定義する抗原であり得る。いくつかの態様において、選択マーカーは、T細胞またはT細胞のサブセットの表面上で発現されるマーカー、例えばCD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RAおよび/またはCD45ROであり得る。T細胞の例は、CMV特異的CD8⁺ Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および調節性T細胞(Treg)等の細胞を含む。Tregの実例は、CD4 CD25 CD45RA Treg細胞を含み、メモリーT細胞の実例は、CD62L CD8⁺特異的セントラルメモリーT細胞を含む。細胞表面分子、例えば選択マーカーはまた、腫瘍細胞のマーカーであり得る。

【0357】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD4であり得、選択物質はCD4に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD4に特異的に結合する選択物質は、抗CD4抗体、抗CD4抗体の二価抗体フラグメント、抗CD4抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD4結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD4抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば、CD4 Fabフラグメント）は、抗体13B8.2またはCD4に対する特異的結合性を保持する13B8.2の機能的に活性な変異体由来であり得る。例えば、抗体13B8.2の例示的な変異体またはm13B8.2は、米国特許第7,482,000号、米国出願番号US2014/0295458または国際特許出願公開WO 2013/124474；およびBes, C, et al. J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)に記載されている。「m13B8.2」と呼ばれる変異Fabフラグメントは、米国特許第7,482,000号に記載されるように、CD4結合マウス抗体13B8.2の可変ドメインならびに重鎖に関してガンマ型の定常ヒトCH1ドメインおよびカッパ型の定常ヒト軽鎖ドメインを含む定常ドメインを有する。いくつかの態様において、抗CD4抗体、例えば抗体13B8.2の変異体は、各々Kabatの番号付けにしたがい、可変軽鎖内のアミノ酸置換H91Aおよび可変軽鎖内のアミノ酸置換Y92A、可変重鎖内のアミノ酸置換H35Aおよび／または可変重鎖内のアミノ酸置換R53Aを含む。いくつかの局面において、m13B8.2内の13B8.2 Fabフラグメントの可変ドメインと比較して、軽鎖の91位（SEQ ID NO:30の93位）のHis残基がAlaに変異しており、重鎖の53位（SEQ ID NO:29の55位）のArg残基がAlaに変異している。いくつかの態様において、抗CD4またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-206または6-8000-205または6-8002-100；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

10

20

【0358】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD8であり得、選択物質はCD8に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD8に特異的に結合する選択物質は、抗CD8抗体、抗CD8抗体の二価抗体フラグメント、抗CD8抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD8結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD8抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば、CD8 Fabフラグメント）は、抗体OKT8（例えば、ATCC CRL-8014）またはCD8に対する特異的結合性を保持するその機能的に活性な変異体由来であり得る。いくつかの態様において、抗CD8またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8003または6-8000-201；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

30

【0359】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD3であり得、選択物質はCD3に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD3に特異的に結合する選択物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD3抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば、CD3 Fabフラグメント）は、抗体OKT3（例えば、ATCC CRL-8001；例えば、Stemberger et al. PLoS One. 2012; 7(4): e35798を参照のこと）またはCD3に対する特異的結合性を保持するその機能的に活性な変異体由来であり得る。いくつかの態様において、抗CD3またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-201、6-8001-100；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

40

【0360】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD25であり得、選択物質はCD25に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD25に特異的に結合する選択物質は、抗CD25抗体、抗CD25抗体の二価抗体フラグメント、抗CD25抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD25結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD25抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば

50

、CD25 Fabフラグメント）は、抗体FRT5（例えば、Stemberger et al. 2012, PLoS One. 2012;7(4):e35798を参照のこと）またはCD25に対する特異的結合性を保持するその機能的に活性な変異体由来であり得る。いくつかの態様において、抗CD4またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-205または6-8000-207または6-8004-050；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

【0361】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD62Lであり得、選択物質はCD62Lに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD62Lに特異的に結合する選択物質は、抗CD62L抗体、抗CD62L抗体の二価抗体フラグメント、抗CD62L抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD62L結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD62L抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば、CD62L Fabフラグメント）は、抗体DREG56（例えば、ATCC HB300；例えば、Stemberger et al. 2012, PLoS One. 2012;7(4):e35798を参照のこと）またはCD62Lに対する特異的結合性を保持するその機能的に活性な変異体由来であり得る。いくつかの態様において、抗CD62Lまたはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-204または6-8005-050；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

【0362】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD45RAであり得、選択物質はCD45RAに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD45RAに特異的に結合する選択物質は、抗CD45RA抗体、抗CD45RA抗体の二価抗体フラグメント、抗CD45RA抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD45RA結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD45RA抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えば、CD45RA Fabフラグメント）は、抗体MEM56（例えば、Millipore 05-1413；例えば、Stemberger et al. 2012, PLoS One. 2012;7(4):e35798を参照のこと）またはCD45RAに対する特異的結合性を保持するその機能的に活性な変異体由来であり得る。いくつかの態様において、抗CD45RAまたはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-208または6-8007-050；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

【0363】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD45ROであり得、選択物質はCD45ROに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD45ROに特異的に結合する選択物質は、抗CD45RO抗体、抗CD45RO抗体の二価抗体フラグメント、抗CD45RO抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD45RO結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD45ROまたはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-209または6-8012-020；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

【0364】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD154であり得、選択物質はCD154に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD154に特異的に結合する選択物質は、抗CD154抗体、抗CD154抗体の二価抗体フラグメント、抗CD154抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を有するタンパク質性CD154結合分子からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、抗CD154またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているまたは市販されている試薬由来である（例えば、カタログ番号6-8000-202または6-5510-050；IBA GmbH, Gottingen, Germany）。

【0365】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD16であり得、かつ選択物質はCD16に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD16に特異的に結合する選択物質は、抗CD16抗体、抗CD16抗体の二価抗体断片、抗CD16抗体の一価抗体断片、および抗体様の結合特性を有

10

20

30

40

50

するタンパク質性CD16結合分子からなる群より選択されうる。いくつかの態様において、抗CD16またはその断片に可逆的に結合する試薬は、市販されているか、または市販されている試薬から誘導される。いくつかの局面において、CD16結合分子は、それぞれSEQ ID N 0: 36および/または37に記載される重鎖および/または軽鎖配列を含む。

【0366】

III. 細胞を培養する方法

組成物中の標的細胞（例えば、T細胞）の表面上の分子に結合することができ、かつ作用物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている作用物質（例えば、第1の、第2の、および/またはさらなる受容体結合物質、例えば刺激物質、または選択物質）の存在下で、標的細胞（例えば、T細胞）を含む該組成物をインキュベートする工程を含む細胞を培養する方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、インキュベーションは、作用物質が細胞上の分子に結合する、例えば特異的に結合する条件下で実施される。いくつかの例において、特定の受容体結合物質（例えば、刺激物質）に関して、そのような結合は、組成物中の標的細胞（例えば、T細胞）においてシグナル、例えば、記載されるような一次シグナルまたはアクセサリシグナルを誘導または調節することができる。いくつかの態様において、分子に対する作用物質の結合は、組成物中の標的細胞の刺激、活性化、増大（増殖）および/または分化の1つまたは複数をもたらす。

【0367】

いくつかの態様において、提供される方法は、細胞、例えばB細胞、T細胞またはナチュラルキラー細胞の集団のエキスポ増大を選択的に誘導するために使用され得る。いくつかの例において、刺激は、外因性成長因子、例えば、リンホカインおよびアクセサリ細胞の非存在下で行われ得る。いくつかの態様において、これらの細胞、例えばB細胞またはT細胞の増殖は、抗原を必要とせずに誘導され、したがって抗原反応性に関してポリクローナルである増大された細胞集団、例えばT細胞集団を提供し得る。本明細書に開示される方法は、元のT細胞集団に対するこれらの細胞の数の数倍の増加をもたらす、T細胞、例えばCD4+またはCD8+ T細胞の、選択された集団の、長期間にわたる持続的増殖を提供し得る。通常、本明細書に記載されるリンパ球集団の（クローン性）増大の場合、すべての子孫は、増大のために選択された細胞集団と同じ抗原特異性を共有し得る。

【0368】

いくつかの態様において、この方法は、抗原特異的T細胞の集団の増大に関する。いくつかの態様において、抗原特異的T細胞の集団を生成するために、T細胞は、T細胞内で一次活性化シグナルを誘発するのに適した形態の抗原と接触させられる、すなわち、抗原は、シグナルがTCR/CD3複合体を通じてT細胞内で誘発されるようT細胞に提示される。例えば、抗原は、MHC分子と共に抗原提示細胞によってT細胞に提示され得る。抗原提示細胞、例えばB細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞またはT細胞に抗原を提示することができる他の細胞は、抗原提示細胞がT細胞に抗原を提示するよう、抗原（例えば、可溶性抗原）の存在下でT細胞と共にインキュベートされ得る。あるいは、関心対象の抗原を発現する細胞が、T細胞と共にインキュベートされ得る。例えば、腫瘍関連抗原を発現する腫瘍細胞が、腫瘍特異的応答を誘導するよう、T細胞と共にインキュベートされ得る。同様に、その病原体の抗原を提示するウイルスなどの病原体に感染した細胞が、T細胞と共にインキュベートされ得る。T細胞の集団の抗原特異的活性化の後、細胞は、提供される方法にしたがい増大され得る。例えば、抗原特異性が樹立された後、T細胞は、本明細書に記載される方法にしたがい、（第1の作用物質として使用される）抗CD3抗体および（第2の作用物質として使用される）抗CD28抗体との培養によって増大され得る。別の態様において、第1の作用物質は、抗原特異的T細胞集団に結合するMHC I：ペプチド複合体であり得る。そのような態様において、公知であり各々のMHC I分子と複合体化され得る任意の抗原特異的ペプチドが使用され得る。あるいは、第1の作用物質として、細胞増大を誘導する受容体の天然リガンドを使用することも可能である。例えば、キメラCD19結合抗原受容体（CAR）を発現するよう形質導入された細胞の細胞内シグナル伝達

10

20

30

40

50

カスケードを活性化させるために、CD19の細胞外ドメインが使用され得る。上記の例示的な局面は、実施例に示されている。

【0369】

いくつかの態様において、複数の細胞を含む組成物を含む試料と多量体形成試薬とを接触させる工程を含む、細胞集団を培養するインビトロ方法が提供される。多量体形成試薬は、細胞の選択、刺激、増大および／または分化に使用され得る、それに可逆的に固定化された（それに結合された）作用物質（第1の、第2の、および／またはさらなる受容体結合物質、例えば刺激物質、または選択物質）を有する。いくつかの態様において、作用物質、例えば第1の作用物質は、細胞に一次活性化シグナルを提供し、多量体形成試薬は、第1の作用物質の可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Z1を含む。第1の作用物質は、少なくとも1つの結合パートナーC1を含み、結合パートナーC1は、多量体形成試薬の結合部位Z1に可逆的に結合することができ、第1の作用物質は、結合パートナーC1と結合部位Z1との間で形成される可逆的結合を通じて多量体形成試薬に結合される。第1の作用物質は、細胞の表面上の受容体分子に結合し、それによって細胞に一次活性化シグナルを提供し、それによって細胞を活性化する。

10

【0370】

いくつかの態様において、多量体形成試薬は、支持体、例えば固体表面に固定化される。いくつかの態様において、多量体形成試薬は、支持体に結合されない、例えば、固体表面または固定相に結合されない。

【0371】

例えば、いくつかの態様において、細胞集団を含む試料と多量体形成試薬とを接触させる工程を含み、多量体形成試薬は固体支持体に固定化されない、すなわち可溶性形態であり、細胞の選択、刺激、増大および／または分化のために使用され得る作用物質（第1または第2の、受容体結合物質、例えば刺激物質、または選択物質）がそれに結合されている、細胞の集団を増大するインビトロ方法が提供される。いくつかの態様において、細胞に一次活性化シグナルを提供する、作用物質、例えば第1の作用物質が、多量体形成試薬に可逆的に結合される。多量体形成試薬は、第1の作用物質の結合のための少なくとも1つの結合部位、例えばZ1を含み、第1の作用物質は、少なくとも1つの結合パートナー、例えばC1を含み、結合パートナーC1は、多量体形成試薬の結合部位Z1に可逆的に結合することができる。いくつかの態様において、第1の作用物質は、結合パートナーC1と結合部位Z1との間で形成される結合を通じて多量体形成試薬に結合され、第1の作用物質は、細胞の表面上の受容体分子に結合し、それによって細胞に一次活性化シグナルを提供し、それによって細胞を活性化する。いくつかの態様において、可溶性の多量体形成物質が使用される場合、結合部分C、例えばC1と、結合部位Z、例えばZ1との間の結合は、可逆的であることを要しない。

20

30

【0372】

いくつかの態様において、提供される方法はまた、例えば細胞上のアクセサリー分子もしくは共刺激分子または他のシグナル伝達分子を標的とする、1つまたは複数の追加のシグナル、例えば共刺激シグナルまたはアクセサリーシグナルを刺激する1つまたは複数の追加の作用物質、例えば第2の作用物質または第3の作用物質がそれに結合されている、多量体形成試薬の使用も含む。いくつかの例において、多量体形成物質は、支持体、例えば固体支持体または固定相に固定化される。いくつかの例において、多量体形成物質は支持体に固定化されない、すなわち可溶性形態である。

40

【0373】

いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の作用物質、例えば第2の作用物質は、結合部位Z（例えば、Z1、Z2、Z3など）に可逆的に結合することができる結合パートナーC（例えば、C1、C2、C3など）を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の作用物質、例えば第2の作用物質は、結合パートナー、例えばC2を含み、結合パートナー、例えばC2は、多量体形成試薬の結合部位、例えばZ2に可逆的に結合することができ、第2の作用物質は、結合パートナーC2と結合部位Z2との間で形成される可逆的結合を通じて

50

多量体形成試薬に結合される。いくつかの態様において、結合パートナーC1と結合部位Z1との間で形成される結合は、可逆的であり得、かつ結合パートナーC2と結合部位Z2との間で形成される結合は、可逆的であり得る。この例において、結合部位Z1と結合パートナーC1との間の可逆的結合および／または結合部位Z2と結合パートナーC2との間の可逆的結合の解離定数 (K_D) は、 10^{-2} M $\sim 10^{-13}$ Mの範囲であり得る。いくつかの局面において、例えば、多量体形成試薬が支持体に結合されない（例えば、固体支持体または固定相に結合されない）場合、結合パートナーC1と結合部位Z1との間で形成される結合は、不可逆的であり得、および／または結合パートナーC2と結合部位Z2との間で形成される結合もまた、不可逆的であり得る。

【0374】

10

いくつかの例において、1つまたは複数の追加の作用物質、例えば第2の作用物質は、細胞の表面上のアクセサリ分子に結合し、それによって活性化された細胞を刺激する。この態様において、第1の作用物質は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを刺激し得、CD3に特異的に結合する結合物質であり得る。この態様において、T細胞上のアクセサリ分子は、CD28であり得、アクセサリ分子に結合する第2の作用物質は、CD28に特異的に結合する結合試薬である。あるいは、いくつかの態様において、いくつかの例において培養細胞の1つまたは複数の特徴（feature）、特性または特徴（characteristic）を変化させ得る、例えば改善し得る、他のアクセサリ分子を標的とすることも利用され得ることが見出されている。いくつかの態様において、アクセサリ分子は、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEM（例えば、それぞれ、抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体および抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体または抗HVEM抗体）の1つまたは複数であり得る。例示的な作用物質、例えば受容体結合物質（例えば、刺激物質）は、以下に記載されている。

20

【0375】

いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の作用物質、例えば第3の作用物質は、細胞の生存、増殖、および／または1つもしくは複数の他の特性をモジュレートする追加の分子に結合する。そのような標的とされる分子は、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体または接着分子を含むが、これらに限定されることはない。いくつかの局面において、そのような追加の分子を通じた刺激は、例えば、持続性の増加、生存の増加および／または枯渇の少ない表現型もしくは活性を含む、刺激または培養された細胞の1つまたは他の改善された特徴をもたらすことができる。例示的な作用物質、例えば受容体結合物質（例えば、刺激物質）は、以下に記載されている。

30

【0376】

いくつかの態様において、提供される方法は、細胞集団の生存性が少なくとも本質的に損なわれない任意の温度で実施され得る。いくつかの態様において、インキュベートまたは培養が実施される条件は、少なくとも本質的に有害でない、弊害をもたらさないまたは少なくとも本質的に生存性を損なわせない、例えば、完全な生存性を保ったまま増大される細胞の集団のパーセンテージが少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも99.5%を含む、少なくとも70%である、任意の条件を含む。いくつかの態様において、提供される方法は、約20℃またはそれより高い温度で実施される。増大される細胞集団に依存して、適当な温度範囲は、例えば、約25℃ $\sim$ 約40℃または約32℃ $\sim$ 37℃を含む、約20℃ $\sim$ 約45℃であり得る。いくつかの態様において、本発明にしたがう方法は、一定の温度値または選択された温度値 $\pm$ 約5℃、 $\pm$ 約4℃、 $\pm$ 約3℃、 $\pm$ 約2℃、 $\pm$ 約1℃または $\pm$ 約0.5℃で実施される。当業者は、細胞および増大条件の性質を考慮して、適当な温度を経験的に決定することができる。典型的に、ヒト細胞は、例えば37℃の温度で増大される。

40

【0377】

本明細書の開示にしたがい、多量体化作用物質、すなわち、細胞の集団においてシグナルを刺激、例えば増大またはモジュレートすることができる1つまたは複数の受容体結合

50

物質に可逆的に結合する多量体形成試薬を含む組成物も、提供される。細胞の集団においてシグナルを刺激、例えば増大またはモジュレートすることができるそのような多量体化作用物質は、支持体に結合されない（例えば、可溶性形態の）多量体形成試薬であり、細胞に一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質の可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位Z、例えばZ1を含み、多量体形成試薬は、それに可逆的に結合された、細胞に一次活性化シグナルを提供する第1の作用物質を有し、第1の作用物質は、少なくとも1つの結合パートナーC、例えばC1を含み、結合パートナーC1は、多量体形成試薬の少なくとも1つの結合部位Z1に可逆的に結合することができ、第1の作用物質は、結合パートナーC1と結合部位Z1との間で形成される可逆的結合を通じて多量体形成試薬に結合される。そのような多量体形成物質は、それに固定化された、本明細書に記載される任意の第1の作用物質を有し得ることに留意されたい。

10

【0378】

いくつかの態様において、本明細書に提供される多量体化作用物質は、細胞の表面上のアクセサリ分子を刺激する第2の作用物質の可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位、例えばZ2をさらに含み得、多量体形成試薬は、それに可逆的に結合された、細胞の表面上のアクセサリ分子を刺激する第2の作用物質を有し、第2の作用物質は、結合パートナー、例えばC2を含み、結合パートナーC2は、多量体形成試薬の少なくとも1つの結合部位Z2に結合することができる。この態様において、第2の作用物質は、結合パートナーC2と結合部位Z2との間で形成される結合を通じて多量体形成試薬に結合される。いくつかの態様において、第2の作用物質は、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMに結合することができる任意のもの（例えば、それぞれ、抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、および抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体または抗HVEM抗体）である。

20

【0379】

いくつかの態様において、本明細書に提供される多量体化作用物質は、細胞の生存、増殖、および/または1つもしくは複数の他の特性をモジュレートする追加の分子に結合する追加の作用物質の可逆的結合のための少なくとも1つの結合部位、例えば、Z1またはZ2と同じまたは異なるZをさらに含み得、多量体形成試薬は、それに可逆的に結合された、細胞の表面上のアクセサリ分子を刺激する追加の作用物質を有し、追加の作用物質は、結合パートナー、例えばC1またはC2と同じまたは異なるCを含み、結合パートナーCは、多量体形成試薬の少なくとも1つの結合部位Zに結合することができる。

30

【0380】

いくつかの態様において、多量体化された作用物質（例えば、抗CD3/抗CD28ムテインストレプトアビジンまたはそのオリゴマー）と共に標的細胞（例えば、T細胞）を含む組成物を培養することは、バイオリアクター、例えば中空繊維バイオリアクター（例えば、Quantum（登録商標）細胞増大システムの中空繊維バイオリアクター）またはプラスチックバッグバイオリアクター（例えば、GE Healthcare製のXuri Cell Expansion System W25において使用されるCellbag（登録商標））において実施され得る。

【0381】

いくつかの態様において、この方法はさらに、（例えば、例えば第1の作用物質および第2の作用物質を通じて多量体形成試薬に結合された標的細胞、例えばT細胞を含む）反応混合物中の培養された標的細胞（例えば、T細胞）を、（i）第1の結合パートナー、例えばC1と結合部位、例えばZ1との間の結合を破壊することができる競合試薬（例えば、遊離した第1の結合パートナーC、例えばC1）もしくはその類似体および/または（例えば、必要な場合）（ii）第2の結合パートナーC2と結合部位Z2との間の結合を破壊することができる第2の競合試薬、例えば遊離した第2の結合パートナー、例えばC2、もしくはその類似体と接触させる工程を含む。そうすることによって、第1の作用物質の結合パートナーC1と結合部位Z1との間の可逆的結合、ならびに第2作用物質の結合パートナーC2と多量体形成試薬の結合部位Z2との間の可逆的結合が破壊され、それによって第1の作用物質および第2の作用物質を通じて多量体形成試薬に結合したT細胞が溶出液中に放出され、T細胞の

40

50

刺激および／または増大が中断される。

【0382】

いくつかの態様において、競合試薬（例えば、第1および／または第2の競合試薬）は、インキュベーションの開始後5日以内、例えばインキュベーションの開始後4日、3日、2日または1日以内に添加される。したがって刺激が中断される時点を制御することによって、多量体化された作用物質から溶出される培養T細胞の1つまたは複数の特定の特徴が、本明細書に記載されるように変更され得る。

【0383】

いくつかの態様において、この方法はさらに、成分の可逆的解離後に残存する1つまたは複数の成分を分離または除去する工程を含む。いくつかの態様において、培養された標的細胞（例えば、T細胞）中の任意の非結合または残存ビオチンが、分離または除去され得る。いくつかの態様において、多量体形成試薬は、培養された標的細胞組成物中の細胞から除去または分離される。例えば、いくつかの態様において、分離／除去は、第2の固定相を用いて実施され得る。この目的で、標的細胞（例えば、T細胞）および可溶性多量体形成試薬を含む混合物が、上記の第1の固定相への適用前または後に、適当な第2の固定相におけるクロマトグラフィーに供される。この第2の固定相は、ゲル濾過マトリクスおよび／または親和性クロマトグラフィーマトリクスであり得、ゲル濾過および／または親和性クロマトグラフィーマトリクスは、親和性試薬を含む。クロマトグラフィー樹脂に含まれる親和性試薬は、多量体形成試薬の結合部位Z1および／または、存在する場合、結合部位Z2に（特異的に）結合し、それによって多量体形成試薬を固定相上に固定化する結合パートナーDを含む。ストレプトアビジンベースの多量体形成試薬が使用され、第1および第2の両方の作用物質が結合パートナーC1またはC2としてストレプトアビジン結合ペプチドを有する場合、この第2の固定相の親和性試薬に含まれる結合パートナーDは、ビオチンであり得る。多量体形成試薬として使用されるストレプトアビジンのまたはストレプトアビジンムテインの可溶性オリゴマーは、その後、クロマトグラフィーマトリクス、例えば市販されているビオチン・セファロース（商標）に通常共有結合により連結されているビオチンに結合する。いくつかのそのような態様において、培養された細胞（例えば、培養されたT細胞）は、多量体形成試薬から回収され得る。

【0384】

A. 細胞

いくつかの態様において、細胞集団の試料は、任意の適当な供給源、典型的には体組織または体液、例えば血液の、すべての試料由来であり得る。後者の例において、試料は、例えば、標準的な単離方法、例えば、血液細胞のフィコール勾配によって取得され得る末梢血単核細胞（PBMC）の集団であり得る。刺激または増大される細胞集団は、しかし、精製された形態でもあり得、米国特許7,776,562、米国特許8,298,782、国際特許出願公開WO 02/054065または国際特許出願公開WO2013/011011に記載される可逆的細胞染色／単離技術を用いて単離され得る。あるいは、細胞の集団はまた、米国特許6,352,694 B1または欧州特許出願EP 0 700 430 B1に記載される負の磁気免疫付着を通じた細胞選別によって取得され得る。本明細書に記載される単離方法が基礎研究で 사용되는場合、試料は、インビトロ細胞培養実験の細胞であり得る。試料は典型的に、液体、例えば溶液または分散液の形態で調製され得る。

【0385】

標的細胞を含む組成物に含まれる細胞は、通常、真核生物細胞、例えば哺乳動物細胞であり、典型的に、ヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞は、血液、骨髄、リンパもしくはリンパ器官由来であるか、または免疫系の細胞、例えば自然もしくは適応免疫の細胞、例えば骨髄もしくは典型的にはT細胞および／もしくはNK細胞であるリンパ球を含むリンパ細胞である。他の例示的な細胞は、幹細胞、例えば複能性および多能性幹細胞を含み、人工多能性幹細胞（iPSC）を含む。細胞は典型的に、初代細胞、例えば対象から直接単離されたおよび／または対象から単離され凍結された細胞である。

【0386】

いくつかの態様において、本明細書で提供される、可逆的に結合される作用物質、例えば多量体化される作用物質は、リンパ球集団またはリンパ球集団に含まれるサブ集団を増大することができる。増大されるリンパ球集団は、任意の適当な集団、例えば、B細胞集団、T細胞集団またはナチュラルキラー細胞集団であり得る。T細胞集団は、抗原特異的T細胞集団、Tヘルパー細胞集団、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、調節性T細胞またはナチュラルキラーT細胞集団であり得る。したがって、多量体化される作用物質のそのような態様において、第1の作用物質は、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを刺激することができる。多量体化される作用物質中に存在する第1の作用物質は、したがって、CD3に特異的に結合する結合試薬であり得、アクセサリー分子に結合する第2の作用物質は、例えば、CD28、CD137、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMに特異的に結合する結合物質であり得る。

10

【0387】

いくつかの態様において、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えば、総T細胞集団、CD3+、CD4+細胞、CD8+細胞およびそれらのサブ集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化、増大、再循環、局在化および／もしくは持続性に関する能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに／または分化度により定義されるものを含む。処置される対象に関して、細胞は、同種および／または自己であり得る。特にこの方法は、既製の方法を含む。いくつかの局面において、例えば既製品技術に関して、細胞は、多能性および／または複能性細胞、例えば幹細胞、例えば人工多能性幹細胞 (iPSC) である。いくつかの態様において、この方法は、対象から細胞を単離する工程、本明細書に記載されるようにそれらを調製、処理、培養および／または改変する工程、ならびに凍結保存の前または後にそれらを同一患者に再導入する工程を含む。

20

【0388】

いくつかの態様において、T細胞、例えば、CD3+、CD4+またはCD8+細胞は、別のマーカーに関してさらに濃縮されない。いくつかの態様において、T細胞は、CD62L+細胞に関してさらに濃縮されない。

【0389】

特に、T細胞ならびに／またはCD4+および／もしくはCD8+ T細胞のサブタイプおよびサブ集団は、ナイーブT (T_N) 細胞、エフェクターT細胞 (T_{EFF})、メモリーT細胞およびそれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT (T_{SCM})、セントラルメモリーT (T_{CM})、エフェクターメモリーT (T_{EM}) または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT) 細胞、自然および適応調節性T (Treg) 細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、アルファ／ベータT細胞、ならびにデルタ／ガンマT細胞である。

30

【0390】

いくつかの態様において、細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。いくつかの態様において、細胞は、単球または顆粒球、例えば骨髓細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、肥満細胞、好酸球および／または好塩基球である。

40

【0391】

細胞の調製

いくつかの態様において、細胞の調製は、1回または複数回の培養および／または調製工程を含む。細胞は、試料、例えば生物学的試料、例えば対象から得られたまたは対象由来のものから単離され得る。いくつかの態様において、細胞を単離する対象は、疾患もしくは状態を有する者または細胞療法を必要とする者または細胞療法を受けるであろう者である。対象は、いくつかの態様において、特定の治療的介入、例えばそのために細胞を単離、処理および／または改変する養子細胞療法を必要とするヒトである。

【0392】

したがって、細胞は、いくつかの態様において、初代細胞、例えば初代ヒト細胞である

50

。試料は、組織、体液および対象から直接採取された他の試料ならびに1つまたは複数の処理工程、例えば分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターを用いた形質導入）、洗浄および／またはインキュベートから得られる試料を含む。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られる試料または処理された試料であり得る。生物学的試料は、それら由来の処理された試料を含む、体液、例えば血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および器官試料を含むがこれらに限定されない。

【0393】

いくつかの局面において、細胞がそれに由来するまたは細胞がそこから単離される試料は、血液もしくは血液由来試料である、またはアフエーシスもしくは白血球アフエーシス産物であるもしくはそれ由来である。例示的な試料は、全血、末梢血単核細胞（PBMC）10、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、頸部、精巣、卵巣、扁桃腺もしくは他の器官、および／またはそれら由来の細胞を含む。試料は、細胞療法、例えば養子細胞療法に関して、自己および同種源由来の細胞を含む。

【0394】

いくつかの態様において、細胞は、細胞株、例えばT細胞株由来である。細胞は、いくつかの態様において、異種供給源から、例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類またはブタから得られる。

【0395】

いくつかの態様において、細胞の単離は、1つまたは複数の調製および／または非親和性ベースの細胞分離工程を含む。いくつかの例において、細胞は、例えば望まない成分を除去するため、望む成分を濃縮するため、特定の試薬に対する感受性を有する細胞を溶解または除去するために、1つまたは複数の試薬の存在下で、洗浄、遠心分離および／またはインキュベートされる。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の特性、例えば密度、接着特性、サイズ、特定の成分に対する感受性および／または耐性に基づき分離される。

【0396】

いくつかの例において、細胞は対象の循環血から、例えばアフエーシスまたは白血球アフエーシスによって得られる。試料は、いくつかの局面において、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球および／または血小板を含むリンパ球を含み、いくつかの局面において、赤血球および血小板以外の細胞を含む。

【0397】

いくつかの態様において、対象から回収された血液細胞は、例えば血漿画分を除去するためおよび細胞をその後の処理工程のための適当な緩衝液または培地に入れるために洗浄される。いくつかの態様において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。いくつかの態様において、洗浄溶液は、カルシウムおよび／もしくはマグネシウムならびに／または多くもしくはすべての二価カチオンを含まない。いくつかの局面において、洗浄工程は、半自動化「フロースルー」型遠心分離装置（例えば、Cobe 2991細胞処理装置、Baxter）を製造元の指示にしたがって用いて達成される。いくつかの局面において、洗浄工程は、タンジェンシャルフロー濾過（TFF）を製造元の指示にしたがって用いて達成される。いくつかの態様において、細胞は、洗浄後に様々な生体適合性緩衝液、例えばCa⁺⁺/Mg⁺⁺非含有PBSに再懸濁される。特定の態様において、血液細胞試料の成分は除去され、細胞は培養培地に直接再懸濁される。

【0398】

いくつかの態様において、この方法は、密度ベースの細胞分離方法、例えば、赤血球の溶解およびPercollまたはFicoll勾配を通じた遠心分離による末梢血からの白血球の調製、を含む。

【0399】

いくつかの態様において、単離方法は、1つまたは複数の特定分子、例えば表面マーカ

10

20

30

40

50

一、例えば表面タンパク質、細胞内マーカーまたは核酸の細胞内での発現または存在に基づく異なる細胞型の分離を含む。いくつかの態様において、そのようなマーカーに基づく任意の公知の分離方法が使用され得る。分離方法は、可逆的試薬システム、例えば作用物質（例えば、受容体結合物質または選択物質）および本明細書に記載される試薬を用いる方法を含む、本明細書に開示される任意の方法を含み得る。

【0400】

いくつかの態様において、分離は、親和性または免疫親和性ベースの分離である。例えば、単離は、いくつかの局面において、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの、当該細胞による発現または発現レベルに基づく、細胞および細胞集団の分離を含み、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートすること、ならびに通常はその後の洗浄工程および抗体または結合パートナーに結合していない細胞から抗体または結合パートナーに結合した細胞を分離することによる分離を含む。

10

【0401】

そのような分離工程は、試薬に結合した細胞がさらなる使用のために維持される正選択、および／または抗体もしくは結合パートナーに結合しなかった細胞が維持される負選択に基づき得る。いくつかの例において、両方の画分が、さらなる使用のために維持される。いくつかの局面において、負選択は、異種集団内である細胞型を特異的に特定する抗体が利用可能でない場合に特に有用であり得、分離は、望まれる集団以外の細胞により発現されるマーカーに基づき最適に実施される。

20

【0402】

分離は、特定の細胞集団または特定のマーカーを発現する細胞の100%濃縮または除去を必要とするものではない。例えば、特定型の細胞、例えばあるマーカーを発現するそれらの正選択または濃縮は、そのような細胞の数またはパーセンテージの増加を表すが、それはそのマーカーを発現しない細胞が完全に存在しないことを必要とするものではない。同様に、特定型の細胞、例えばあるマーカーを発現する細胞の負選択、除去または排除は、そのような細胞の数またはパーセンテージの減少を表すが、すべてのそのような細胞が完全に除去されることを必要とするものではない。

【0403】

いくつかの例において、1回の工程から正または負選択された画分を、別の分離工程、例えば後続の正または負選択に供する、複数回の分離工程が実施される。いくつかの例において、1回の分離工程は、複数のマーカーを同時に発現する細胞を、例えば、各々が負選択の標的となるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、排除し得る。同様に、様々な細胞型において発現される複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型が同時に正選択され得る。

30

【0404】

例えば、いくつかの局面において、T細胞の特定のサブ集団、例えば、1つまたは複数の表面マーカーについて陽性であるかまたはそれを高レベルで発現する細胞、例えば、CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺および／またはCD45RO⁺ T細胞が、正または負選択技術によって単離される。

40

【0405】

例えば、CD3⁺、CD28⁺ T細胞は、CD3/CD28コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYNABEA DS M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正選択され得る。

【0406】

いくつかの態様において、単離は、正選択による特定の細胞集団の濃縮、または負選択による特定の細胞集団の排除によって、実施される。いくつかの態様において、正または負選択は、それぞれ正または負選択される細胞において発現される（マーカー⁺）かまたは相対的に高いレベルで発現される（マーカー^高）1つまたは複数の表面マーカーに特異的に結合する1つまたは複数の抗体または他の結合物質と共に細胞をインキュベートする

50

ことによって達成される。

【0407】

いくつかの態様において、T細胞は、非T細胞、例えばB細胞、単球または他の白血球において発現されるマーカー、例えばCD14の負選択によってPBMC試料から分離される。いくつかの局面において、CD4⁺またはCD8⁺選択工程は、CD4⁺ヘルパーおよびCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD4⁺またはCD8⁺集団はさらに、1つまたは複数のナイーブ、メモリーおよび／またはエフェクターTサブ集団において発現されるかまたは相対的に高い程度発現されるマーカーについての正または負選択によってサブ集団に分類され得る。

【0408】

いくつかの態様において、CD8⁺細胞はさらに、例えばそれぞれのサブ集団に関連する表面抗原に基づく正または負選択によって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリーおよび／またはセントラルメモリー幹細胞について濃縮される、またはそれらを排除される。いくつかの態様において、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞の濃縮は、効能を高めるために、例えば投与後の長期間の生存、増大および／または生着を改善するために実施され、それは、いくつかの局面において、そのようなサブ集団において特に確実である。Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701を参照のこと。いくつかの態様において、T_{CM}濃縮CD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞の混合は、効果をさらに向上させる。

【0409】

態様において、メモリーT細胞は、CD8⁺末梢血リンパ球のCD62L⁺およびCD62L⁻の両サブセットに存在する。PBMCは、例えば抗CD8および抗CD62L抗体を用いて、CD62L⁻CD8⁺および／もしくはCD62L⁺CD8⁺画分について濃縮され得るまたはそれらを排除され得る。

【0410】

いくつかの態様において、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞についての濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3および／またはCD127の陽性または高い表面発現に基づき、いくつかの局面において、それはCD45RAおよび／またはグランザイムBを発現するまたは高度に発現する細胞についての負選択に基づく。いくつかの局面において、T_{CM}細胞について濃縮されたCD8⁺集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現する細胞の排除およびCD62Lを発現する細胞についての正選択または濃縮によって実施される。1つの局面において、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞についての濃縮は、CD4発現に基づいて選択された細胞の陰性の画分から出発し、これがCD14およびCD45RAの発現に基づく負選択およびCD62Lに基づく正選択に供されることによって実施される。そのような選択は、いくつかの局面において、同時に実施され、他の局面においては、いずれかの順で順次実施される。いくつかの局面において、CD8⁺細胞集団またはサブ集団を調製するのに使用したのと同じCD4発現ベースの選択設定が、CD4⁺細胞集団またはサブ集団を生成するためにも使用され、したがってCD4ベースの分離からの陽性および陰性の両画分が維持され、任意で1回または複数回のさらなる正または負選択工程を行った後に、この方法の後続の工程において使用される。

【0411】

CD4⁺ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによって、ナイーブ、セントラルメモリーおよびエフェクター細胞に分類される。CD4⁺リンパ球は、標準的な方法によって取得され得る。いくつかの態様において、ナイーブCD4⁺ Tリンパ球は、CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺ T細胞である。いくつかの態様において、セントラルメモリーCD4⁺細胞は、CD62L⁺およびCD45RO⁺である。いくつかの態様において、エフェクターCD4⁺細胞は、CD62L⁻およびCD45RO⁻である。

【0412】

1つの例において、負選択によりCD4⁺細胞について濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様において、抗体または結合パートナーは、正および／または負選択によ

10

20

30

40

50

り細胞を分離できるよう、固体支持体またはマトリクス、例えば磁気ビーズまたは常磁性ビーズに結合される。例えば、いくつかの態様において、細胞および細胞集団は、(Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (著作権) Humana Press Inc., Totowa, NJで概説されている) 免疫磁気 (または親和性磁気) 分離技術を用いて分離または単離される。

【0413】

いくつかの局面において、分離される細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能なまたは磁気反応性の材料、例えば磁気反応粒子または微粒子、例えば常磁性ビーズ (例えば、DynabeadsまたはMACSビーズ) と共にインキュベートされる。磁気反応性材料、例え

10

【0414】

いくつかの態様において、磁気粒子またはビーズは、特異的結合メンバー、例えば抗体または他の結合パートナーに結合された磁気反応性材料を含む。多くの周知の磁気反応性材料が、磁気分離方法において使用される。適当な磁気粒子は、参照により本明細書に組み入れられるMoldayの米国特許第4,452,773号および欧州特許明細書EP 452342 Bに記載されるものを含む。コロイド状のサイズ指定された粒子、例えばOwenの米国特許第4,795,698号およびLibertiらの米国特許第5,200,084号に記載されるものが、他の例である。

20

【0415】

インキュベーションは通常、磁気粒子またはビーズに付着された、抗体もしくは結合パートナーまたはそのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば二次抗体もしくは他の試薬が、試料中の細胞上に存在する場合に細胞表面分子に特異的に結合する条件下で、実施される。

【0416】

いくつかの局面において、試料は磁場に置かれ、磁気反応性または磁化可能粒子が付着された細胞は、磁石に誘引され、非標識細胞から分離される。正選択の場合、磁石に誘引される細胞が維持され、負選択の場合、誘引されない細胞 (非標識細胞) が維持される。いくつかの局面において、同じ選択工程の間に正および負選択の組み合わせが実施され、正および負画分が維持され、さらに処理されるかまたはさらなる分離工程に供される。

30

【0417】

特定の態様において、磁気反応性粒子は、一次抗体もしくは他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素またはストレプトアビジンでコーティングされる。特定の態様において、磁気粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを通じて細胞に付着される。特定の態様において、ビーズではなく細胞が、一次抗体または結合パートナーによって標識され、次いで細胞型特異的な二次抗体または他の結合パートナー (例えばストレプトアビジン) でコーティングされた磁気粒子が添加される。特定の態様において、ストレプトアビジンコーティングされた磁気粒子が、ビオチニル化された一次または二次抗体と組み合わせて使用される。

40

【0418】

いくつかの態様において、磁気反応性粒子は、その後にインキュベート、培養および/または改変される細胞に付着したまま維持され、いくつかの局面において、粒子は、患者に投与するための細胞に付着したまま維持される。いくつかの態様において、磁化可能または磁気反応性粒子は、細胞から除去される。細胞から磁化可能粒子を除去する方法は公知であり、例えば、競合する非標識抗体、磁化可能粒子または切断可能なリンカーにコンジュゲートされた抗体等の使用を含む。いくつかの態様において、磁化可能粒子は、生分解性である。

【0419】

いくつかの態様において、親和性ベースの選択は、磁気活性化細胞選別 (MACS) (Milt

50

enyi Biotech, Auburn, CA) を通じた選択である。磁気活性化細胞選別 (MACS) システムは、磁化粒子が付着した細胞の高純度選択を実現する。特定の態様において、MACSは、外部磁場の適用後に非標的種および標的種が順次溶出される様式で動作する。すなわち、磁化粒子が付着した細胞はその場で維持され、非付着種が溶出する。次いで、この第1の溶出工程が完了した後に、磁場内で捕捉され溶出を妨げられていた種が、溶出し回収されるように何らかの形で自由にされる。特定の態様において、非標的細胞は、標識され、異種細胞集団から排除される。

【0420】

特定の態様において、単離または分離は、この方法の単離、細胞調製、分離、処理、インキュベート、培養および／または製剤化工程の1つまたは複数を実施するシステム、デバイスまたは装置を用いて実施される。いくつかの局面において、システムは、閉鎖または滅菌環境下でこれらの工程の各々を実施するよう、例えば、失敗、使用者による操作および／または混入を最小限に抑えるよう、使用される。1つの例において、システムは、国際特許出願公開WO2009/072003またはUS 20110003380 A1に記載されるシステムである。

【0421】

いくつかの態様において、システムまたは装置は、統合型もしくは内蔵型システム内および／または自動もしくはプログラム可能様式で、単離、処理、改変および製剤化工程の1つまたは複数、例えばすべてを実施する。いくつかの局面において、システムまたは装置は、使用者が処理、単離、改変および製剤化工程の結果をプログラム、制御、評価できるならびに／またはそれらの工程の様々な局面を調節できるようにする、システムまたは装置と連携するコンピュータおよび／またはコンピュータプログラムを含む。

【0422】

いくつかの局面において、分離および／または他の工程は、例えば、閉鎖滅菌システムにおける臨床規模レベルでの細胞の自動分離のために、CliniMACSシステム (Miltenyi Biotec) を用いて実施される。構成要素は、統合マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプおよび様々なピンチ弁を含み得る。統合コンピュータは、いくつかの局面において、機器のすべての構成要素を制御し、繰り返される手順を標準化された順でシステムに実施させる。磁気分離ユニットは、いくつかの局面において、可動式永久磁石および選択カラム用ホルダーを含む。蠕動ポンプは、配管一式を通じて流速を制御し、ピンチ弁と共に、システムを通る緩衝液の流れの制御および細胞の継続的な分離を確実にする。

【0423】

CliniMACSシステムは、いくつかの局面において、滅菌、非発熱性溶液で供給される抗体結合磁化可能粒子を使用する。いくつかの態様において、細胞が磁気粒子で標識された後、過剰な粒子を除去するために細胞は洗浄される。その後、細胞調製バッグが配管一式に接続され、これがさらに緩衝液を含むバッグおよび細胞回収バッグに接続される。配管一式は、プレカラムおよび分離カラムを含む組み立て済み滅菌管からなり、一回使いきりである。分離プログラムの開始後、システムは自動的に細胞試料を分離カラムに投入する。標識された細胞はカラム内で維持され、非標識細胞は一連の洗浄工程によって除去される。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は標識されず、カラム内で維持されない。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は標識され、カラム内で維持される。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法において使用される細胞集団は、磁場の除去後にカラムから流出され、細胞回収バッグに回収される。

【0424】

特定の態様において、分離および／または他の工程は、CliniMACS Prodigyシステム (Miltenyi Biotec) を用いて実施される。CliniMACS Prodigyシステムは、いくつかの局面において、遠心分離による細胞の自動洗浄および分画を可能にする細胞処理ユニットを装備している。CliniMACS Prodigyシステムはまた、オンボードカメラおよび巨視的なソース細胞産物の層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する画像認識ソフトウェアを含み得る。例えば、末梢血は、自動的に赤血球、白血球および血漿層に

分離され得る。CliniMACS Prodigyシステムはまた、細胞培養プロトコル、例えば細胞の分化および増大、抗原添加および長期的細胞培養を行う統合型細胞培養チャンバーを含み得る。投入口は、培地の無菌的除去および補充を可能にし得、細胞は統合型顕微鏡を用いてモニターされ得る。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82、およびWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701を参照のこと。

【0425】

いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞集団は、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が流体の流れで運搬されるフローサイトメトリーを通じて、回収および濃縮（または排除）される。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞集団は、調製目的（FACS）選別を通じて回収および濃縮（または排除）される。特定の態様において、本明細書に記載される細胞集団は、FACSベースの検出システムと組み合わせた微小電気機械システム（MEMS）チップの使用によって回収および濃縮（または排除）される（例えば、WO 2010/033140、Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573；およびGodin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376を参照のこと）。両方の例において、細胞は、十分に定義されたT細胞サブセットの高純度の単離が可能なように複数のマーカーで染色され得る。

10

【0426】

いくつかの態様において、抗体また結合パートナーは、正および／または負選択のための分離を容易にするために、1つまたは複数の検出マーカーで標識される。例えば、分離は、蛍光標識された抗体への結合に基づき得る。いくつかの例において、1つまたは複数の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、例えば調製目的（FACS）を含む蛍光活性化細胞選別（FACS）および／または例えばフローサイトメトリー検出システムと組み合わせた微小電気機械システム（MEMS）チップによって、流体の流れの中で実施される。そのような方法は、複数のマーカーに基づく同時の正および負選択を可能にする。

20

【0427】

いくつかの態様において、調製方法は、単離、インキュベートおよび／または改変の前または後のいずれかに、細胞を凍結、例えば凍結保存する工程を含む。いくつかの態様において、凍結およびその後の解凍工程は、細胞集団内の顆粒球および、一定程度、単球を除去する。いくつかの態様において、細胞は、例えば血漿および血小板を除去する洗浄工程の後に、凍結溶液中に懸濁される。いくつかの局面において、任意の様々な公知の凍結溶液およびパラメータが使用され得る。1つの例は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン（HSA）を含むPBSまたは他の適当な細胞凍結培地を使用する。これはその後、DMSOおよびHSAの終濃度がそれぞれ10%および4%となるよう培地で1:1希釈される。細胞はその後、毎分1°の速度で-80℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相の中で保管される。

30

【0428】

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子改変の前にまたはそれに関連してインキュベートおよび／または培養される。インキュベート工程は、培養（culture）、培養（cultivation）、刺激、活性化および／または繁殖を含み得る。いくつかの態様において、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件は、集団内の細胞の増殖、増大、活性化および／もしくは生存を誘導するよう、抗原曝露を模倣するよう、ならびに／または遺伝子改変のため、例えば組換え抗原受容体の導入のために細胞を準備するよう設計されたものを含む。

40

【0429】

条件は、特定の培地、温度、酸素量、二酸化炭素量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび／または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体および細胞を活性化するよう設計された任意の他の作用物質の1つまたは複数を含み得る。

50

【0430】

いくつかの態様において、刺激条件または作用物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの局面において、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを起動または始動させる。そのような作用物質は、例えば固体支持体、例えばビーズに結合された、抗体、例えばTCR成分および／もしくは共刺激受容体に特異的なもの、例えば、抗CD3、抗CD28、ならびに／または1つもしくは複数のサイトカインを含み得る。任意で、増大方法はさらに、（例えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で）培養培地に抗CD3および／または抗CD28抗体を添加する工程を含み得る。いくつかの態様において、刺激性の作用物質は、IL-2および／またはIL-15、例えば少なくとも約10ユニット/mLのIL-2濃度を含む。

10

【0431】

いくつかの局面において、インキュベーションは、Riddellらに対する米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82および／またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701に記載されるような技術にしたがい実施される。

【0432】

いくつかの態様において、T細胞は、組成物にフィーダー細胞、例えば非分裂末梢血単核細胞（PBMC）を（例えば、得られる細胞集団が、増大しようとする初期集団内の各Tリンパ球につき少なくとも約5、10、20もしくは40個またはそれ以上のPBMCフィーダー細胞を含むように）添加し、培養物を（例えば、T細胞数が増大されるのに十分な時間）インキュベートすることによって増大される。いくつかの局面において、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射されたPBMCフィーダー細胞を含み得る。いくつかの態様において、PBMCは、細胞分裂を防ぐために、約3000～3600ラドの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの局面において、フィーダー細胞は、T細胞集団の添加前に培養培地に添加される。

20

【0433】

いくつかの態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の増殖に適した温度、例えば、少なくとも摂氏約25度、通常少なくとも約30度、および通常摂氏37度もしくは約37度を含む。任意で、インキュベーションはさらに、フィーダー細胞としての非分裂EBV形質転換リンパ芽球様細胞（LCL）の添加を含み得る。LCLは、約6000～10,000ラドの範囲のガンマ線で照射され得る。LCLフィーダー細胞は、いくつかの局面において、任意の適当な量、例えば少なくとも約10：1のLCLフィーダー細胞 対 初期Tリンパ球の比で提供される。

30

【0434】

態様において、抗原特異的T細胞、例えば抗原特異的CD4+および／またはCD8+ T細胞は、ナイーブまたは抗原特異的Tリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、抗原特異的T細胞株またはクローンは、サイトメガロウイルス抗原に対して、感染対象からT細胞を単離し、細胞をインビトロで同抗原によって刺激することによって生成され得る。

【0435】

B. 装置および製造物品

40

いくつかの態様において、装置または製造物品も提供される。いくつかの態様において、バイオリクターおよびクロマトグラフィーのための第1の固定相の配置が提供される。バイオリクターは、細胞の増大に適しており、固定相は、細胞の分離および試薬の除去に適している。第1の固定相は、ゲル濾過マトリクスおよび／または親和性クロマトグラフィーマトリクスであり、ゲル濾過マトリクスおよび／または親和性クロマトグラフィーマトリクスは、親和性試薬、例えば記載されたような多量体形成試薬を含み、該試薬は、第1の作用物質に含まれる結合パートナーC（例えば、C1）に特異的に結合する結合部位Z（例えば、Z1）を含み、かつ／または親和性試薬、例えば記載されたような多量体形成試薬は、第2の作用物質に含まれる結合パートナーC（例えば、C2）に特異的に結合する結合部位Z（例えば、Z2）を含む。いくつかの態様において、ゲル濾過マトリクスおよび／

50

または親和性クロマトグラフィーマトリクスは、親和性試薬、例えば記載されたような多量体形成試薬を含み、該試薬は、追加の作用物質に含まれる結合パートナーC（例えば、第1または第2の作用物質に含まれるものと同じまたは異なる）に特異的に結合する結合部位Z（例えば、第1または第2の作用物質と同じまたは異なる）を含む。それによって第1の固定相は、第1の作用物質、第2の作用物質、および／または追加の作用物質、結合パートナーC、例えば第1の結合パートナーC1および／または遊離した第2の結合パートナーC2を自身に固定化するのに適している。加えて、バイオリアクターおよび固定相は、流体的に接続される。この配置は、上で説明されているような連続増大で使用され得、公知の細胞増大システム、例えばQuantum（登録商標）細胞増大システムまたはXuri Cell Expansion System W25に組み込まれ得る。

10

【0436】

この配置において、第1の固定相は、クロマトグラフィーカラムに含まれるかまたは平面的な固定相であるかのいずれかである。この配置はさらに、第1の固定相に流体的に接続された第2の固定相を含み得る。第2の固定相は、ゲル濾過マトリクスおよび／または親和性クロマトグラフィーマトリクスであり得、ゲル濾過および／または親和性クロマトグラフィーマトリクスは親和性試薬を含む。この親和性試薬は、多量体形成試薬の結合部位Z1に（特異的に）結合する結合パートナーDを含み得、そのため固定相への多量体形成試薬の固定化に適する。

【0437】

上記のようなバイオリアクターならびにクロマトグラフィー用の第1の固定相または第2の固定相の少なくとも1つの配置を含む、細胞の組成物の精製（例えば、選択）および培養、例えば刺激または増大のための装置も提供される。

20

【0438】

この装置はさらに、流体的に直列に接続されたバイオリアクターおよび固定相の複数の配置を含み得る。

【0439】

この装置は、バイオリアクターおよびクロマトグラフィー用の固定相の配置におけるバイオリアクターに流体的に接続された試料投入口を含み得る。この装置はまた、精製および増大された標的細胞用の試料流出口を含み得、試料流出口は、バイオリアクターおよびクロマトグラフィー用の固定相の少なくとも1つの配置の最後の固定相に、流体的に接続

30

【0440】

いくつかの態様では、この装置は、機能的に閉鎖されたシステムとして設計され得る。

【0441】**C. 培養細胞の例示的な特徴**

いくつかの態様において、本明細書に提供される方法にしたがい生成または生産された培養細胞を含み得る培養標的細胞（例えば、培養T細胞）は、それらの増殖能、表面マーカー発現、分化状態、活性化状態および／または代謝プロファイルに基づくまたは関連する1つまたは複数の特定の表現型および／または機能的特徴を示す。いくつかの態様において、提供される方法のいずれかにしたがう標的細胞の培養（例えば、T細胞の培養）は、細胞の機能（例えば、機能的活性の増加もしくは減少）または表現型（例えば、マーカーもしくはマーカー群のより高いもしくはより低い発現）に関連するパラメータを、本明細書に提供される方法にしたがいインキュベート前の組成物中の細胞の対応するまたは各々の機能または表現型と比較して変化させる。いくつかの態様において、培養T細胞は、増大および／もしくは増殖活性、CD4+/CD8+ T細胞分布もしくは比率、表面マーカー発現、機能的活性または代謝プロファイルのパラメータに関する変化を示す。

40

【0442】

いくつかの態様において、培養T細胞において測定されるパラメータの変化は、参照T細胞組成物または調製物において測定される同じまたは類似のパラメータと比較される。典型的に、参照T細胞組成物または調製物中のT細胞は、そのような細胞がそのインキュベ

50

ションに供されなかったまたは異なるインキュベーションに供されたことを除いて、可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）前と同じまたは実質的に同じT細胞の組成物を含むかまたはそれ由来である。いくつかの態様において、参照T細胞調製物は、参照T細胞調製物におけるそのようなインキュベーションの少なくとも1つの局面およびいくつかの例では1つのみの局面が、培養T細胞を生産するインキュベーションにおけるそれと異なることを除いて、実質的に同じプロトコルまたは条件（例えば、刺激物質のタイプ、刺激物質の形式、実質的に同じ出発細胞数、洗浄、追加試薬の存在または非存在、インキュベーションのタイミング、インキュベーションの温度）を用いるインキュベーションに供される。いくつかの態様において、参照T細胞調製物は、インキュベーションが多量体形成試薬を用いて行われなくても代わりに受容体結合物質、例えば刺激物質が代替の様式で提示されている、例えば、支持体（例えば固体支持体）、例えばビーズ、粒子、磁性粒子もしくはビーズ、ナノ粒子、またはマイクロスフィアに対して直接的にかつ/または不可逆的に結合またはコンジュゲートされているものである。

【0443】

いくつかの態様において、参照T細胞組成物または調製物は、可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）前のT細胞を含む組成物である。

【0444】

いくつかの態様において、培養T細胞は、5日未満の可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）によって生成され、および/またはそのような作用物質と細胞上の1つまたは複数の分子との結合は（例えば、競合試薬、例えばビオチンまたはビオチン類似体の存在下で）破壊される、例えばそのような作用物質とのインキュベーションの開始から5日以内に破壊される。例えば、いくつかの局面において、培養T細胞は、本明細書に記載されるように可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、インキュベーションは、そのようなインキュベーションの開始後5日以内（例えば、4、3、2もしくは1日以内または約4、3、2もしくは1日以内、またはそれ未満）に終了および/または中断され、ならびに/または可逆的に結合された作用物質を細胞から解離させる競合物質（例えば、ビオチン）が、そのようなインキュベーションの開始後5日以内（例えば、4、3、2もしくは1日以内または約4、3、2もしくは1日以内、またはそれ未満）にインキュベートされた細胞に添加される。いくつかの態様において、参照T細胞調製物は、同じまたは実質的に同じ可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産されるが、インキュベートが5日より長い間実施される場合、細胞内で誘導または調整されたシグナルを減少または停止させるよう終了および/または中断されない、ならびに/またはT細胞調製物は、試薬を細胞から解離させる競合物質（例えば、ビオチンもしくはビオチン類似体）の添加なしで生産される。

【0445】

いくつかの態様において、培養T細胞は、受容体結合物質（例えば、刺激物質）がCD28に結合しないおよび/またはシグナル伝達を誘導しない、すなわち、抗CD28抗体またはそのフラグメントではない、可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）によって生成される。例えば、いくつかの態様において、培養T細胞は、1つまたは複数の刺激物質がムテインストレプトアビジンに可逆的に

結合され、少なくとも1つの刺激物質がCD3に特異的（例えば、抗CD3抗体またはそのフラグメント）であり、第2の刺激物質がCD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMの1つまたは複数に特異的（例えば、それぞれ、抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、および抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体もしくは抗HVEM抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント）であり得る、可逆的に結合される試薬とのインキュベート後に生産または生成される。いくつかの態様において、参照T細胞調製物は、可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産されるT細胞培養物であるが、試薬はCD28に特異的に結合するおよび／またはCD28シグナルを誘導もしくは調整する作用物質を含む。例えば、いくつかの態様において、参照T細胞調製物は、T細胞組成物と抗CD3/抗CD28 Dynabeads（登録商標）、抗CD3/抗CD28 ExPact（登録商標）ビーズまたは他の抗CD3/抗CD28刺激物質とのインキュベート後に生成または生産される。いくつかの態様において、そのような他の抗CD3/抗CD28刺激物質は、抗体試薬が支持体（例えば、固体支持体）、例えばビーズ、粒子、磁気粒子もしくはビーズ、ナノ粒子またはマイクロスフィアに結合されているものである。いくつかの態様において、培養T細胞は、可溶性である、すなわち支持体（例えば、固体支持体）に結合されていない可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）により調製される。

10

【0446】

20

例えば、いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で増強された増大および／または増殖能によって特徴づけられる、例えば本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される、培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、増強された増大および／または増殖能は、参照T細胞組成物または調製物中のCD3+ T細胞、CD4+ T細胞および／またはCD8+ T細胞の数またはパーセンテージとそれぞれ比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）の、培養T細胞中のCD3+ T細胞、CD4+ T細胞および／またはCD8+ T細胞の数またはパーセンテージの増加を含む。

30

【0447】

いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物との比較で増強されたCD3+ T細胞の増大および／または増殖能によって特徴づけられる、例えば本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される、培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、増強された増大および／または増殖能は、参照T細胞組成物または調製物中のCD3+ T細胞の数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）の、培養T細胞中のCD3+ T細胞の数またはパーセンテージの増加を含む。

40

【0448】

いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で増強されたCD4+ T細胞の増大および／または増殖能によって特徴づけられる、例えば本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される、培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、増強された増大および／または増殖能は、参照T細胞組成物または調製物中のCD4+ T細胞の数またはパーセンテージ

50

ジと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）の、培養T細胞中のCD4+ T細胞の数またはパーセンテージの増加を含む。

【0449】

いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で増強されたCD8+ T細胞の増大および／または増殖能によって特徴づけられる、例えば本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される、培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、増強された増大および／または増殖能は、参照T細胞組成物または調製物中のCD8+ T細胞の数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）の、培養T細胞中のCD8+ T細胞の数またはパーセンテージの増加を含む。

10

【0450】

いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で変化したCD8+/CD4+ T細胞分布または正規化T細胞分布、例えば変化したCD8+/CD4+比率または正規化CD8+/CD4+ T細胞比率によって特徴づけられる、例えば本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される、培養T細胞が提供される。CD8+/CD4+比率または正規化された比率は、増加または減少し得る。いくつかの態様において、変化したCD8+/CD4+ T細胞比率は、参照組成物または調製物における数もしくはパーセンテージまたは正規化された数もしくはパーセンテージに対するまたはそれと比較しての、培養T細胞におけるCD8+ T細胞の数もしくはパーセンテージまたは正規化された数もしくはパーセンテージの増加によりもたらされる。いくつかの態様において、培養T細胞中のCD8+ T細胞の数は、参照T細胞組成物または調製物中のCD8+ T細胞の数もしくはパーセンテージまたはCD8+ T細胞の正規化された数もしくはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。いくつかの態様において、CD8+/CD4+ T細胞の比率または正規化されたCD8+/CD4+の比率は、参照T細胞組成物または調製物におけるCD8+/CD4+ T細胞の比率または正規化されたCD8+/CD4+の比率と比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。いくつかの態様において、培養T細胞または組成物もしくは調製物における数、パーセンテージまたは比率は、インキュベート前のT細胞を含む出発組成物における数、パーセンテージまたは比率に対して正規化される。

20

30

【0451】

いくつかの態様において、本明細書に記載される可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で変化した表面マーカー発現プロファイルによって特徴づけられる、本明細書に提供される方法のいずれかにしたがって調製される培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、変化した表面マーカー発現プロファイルは、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69、CCR7、CD27、CD28、CD122、T-bet、IL-7R α 、CD95、IL-2R β 、CXCR3、LFA-1、KLRG1から選択される1つまたは複数の表面マーカーに関して陽性、陰性、高または低であるT細胞の1つまたは複数のサブセットの数またはパーセンテージの変化に起因する。いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセットの数またはパーセンテージは、参照組成物または調製物中のT細胞サブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

40

50

【0452】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット（例えば、参照組成物または調製物と比較して培養T細胞において増加したT細胞サブセット）は、参照T細胞組成物または調製物と比較して低下または減少した分化または活性化状態を示す。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、エフェクターT細胞（ T_E ）もしくはエフェクターメモリーT細胞（ T_{EM} ）表現型ではないまたはそれらを含まない。いくつかの態様において、T細胞のサブセットは、 $CD62L^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ または $KLRG1^{low/-}$ の1つまたは複数である表面表現型を含む。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

10

【0453】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット（例えば、参照組成物または調製物と比較して培養T細胞において増加したT細胞サブセット）は、 $CD62L$ および／もしくは $IL-7R\alpha$ （ $CD127$ ）について陽性ならびに／または $t-bet$ について陰性もしくは低である。いくつかの態様において、T細胞のサブセットは、 $CD45RA$ について陽性および／または $CD45RO$ について陰性もしくは低である。いくつかの態様において、T細胞のサブセットは、 $CCR7$ 、 $CD45RA$ 、 $CD62L$ 、 $CD27$ 、 $CD28$ 、 $IL-7R\alpha$ （ $CD127$ ）、 $CD95$ 、 $IL-2R\beta$ 、 $CXCR3$ および $LFA-1$ の1つもしくは複数について陽性であり、ならびに／または $CD45RO$ について陰性である。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

20

【0454】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット（例えば、参照組成物または調製物と比較して培養T細胞において増加したT細胞サブセット）は、 $CD62L$ について陽性（ $CD62L^+$ ）である細胞であるまたはそのような細胞を含む。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

30

【0455】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット（例えば、参照組成物または調製物と比較して培養T細胞において増加したT細胞サブセット）は、 $CD62L$ ならびに(a) $CD45RA^{low/+}$ 、 $CD45RO^{low/+}$ 、 $CCR7^+$ および $CD27^+$ の任意の1つまたは複数および(b) $t-bet^{low}$ 、 $IL-7R\alpha^+$ （ $CD127^+$ ）、 $CD95^+$ 、 $IL-2R\beta^+$ 、 $CXCR3^+$ および $LFA-1^+$ の任意の1つまたは複数である細胞であるまたはそのような細胞を含む。いくつかの態様において、T細胞サブセットはまた、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ または $CD8^+$ であり得る。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

40

【0456】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット、例えば $CD62L^+$ T細胞は、メモリーT細胞またはその特定のサブセット、例えば、長寿命メモリーT細胞であるまたはそれらを含むまたはそれらと表現型の特徴を共有している。いくつかの態様において、そのようなメモリーT細胞は、セントラルメモリーT細胞（ T_{CM} ）またはTメモリー幹細胞（ T_{SCM} ）である。いくつかの態様において、メモリーT細胞は、 T_{SCM} 細胞である。 T_{SCM} 細胞は、他のメモリーT細胞サブセットと比較してまたはナイーブT細胞と比較して1つまたは複数の表現型の違いまたは機能的特徴を有する、例えば、より分化度が低いまたはよりナイーブであるものと、説明され得る（例えば、Ahlers and Belyakov (2010) Blood, 115:1678); Cieri et al. (2015) Blood, 125:2865; Flynn et al. (2014) Clinical & Translati

50

onal Immunology, 3, e20; Gattinoni et al. (2012) Nat. Med., 17:1290-1297; Gattinoni et al. (2012) Nat. Reviews, 12:671; Li et al. (2013) PLOS ONE, 8:e67401; および公開PCT出願番号WO2014/039044を参照のこと)。いくつかの例において、 T_{SCM} 細胞は、エフェクターT細胞およびメモリーT細胞の3つすべてのサブセット (T_{SCM} 、 T_{CM} および T_{EM}) を生成することができる唯一のメモリーT細胞であると考えられる。いくつかの局面において、 T_{SCM} 細胞は、すべてのメモリーT細胞サブセットの中で抗原的または恒常的刺激に対して最も高い生存および増殖応答、ならびに同族抗原が不在の場合最小の自然減を示す。いくつかの態様において、低分化 T_{SCM} 細胞は、他のメモリーT細胞よりも養子移入後により大きな増大、長期の生存および標的細胞破壊を示し得、したがって、 T_{CM} または T_{EM} 細胞のいずれかで実現できるものよりも少ない移入細胞でより効果的な処置を媒介することが可能であり得る。

10

【0457】

いくつかの局面において、 T_{SCM} 細胞に関して報告されているまたは公知となっている表現型または機能的特徴の例は、例えば、そのような細胞がa) $CD45R0^-$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $IL-7R\alpha^+$ 、 $CD95^+$ 、 $IL-2R\beta^+$ 、 $CXCR3^+$ および $LFA-1^+$ である；b) $CD45RA^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ および $CD95^+$ である；c) $CD45RA^+$ 、 $CD45R0^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD95^+$ および $IL-2R\beta^+$ である；d) $CD45R0^-$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD127^+$ および $CD95^+$ である；e) $CD45RA^+$ 、 $CD44^{+/-}$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD127^+$ 、 $IL-2R\beta^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD43^-$ 、 $KLRG1^-$ 、パーフォリン (Peforin) $^-$ およびグランザイムB $^-$ である；f) 高レベルの $CCR7$ 、 $CD62L$ 、 $CD27$ および $CD28$ 、中程度のレベルの $CD95$ および $IL-2R\beta$ 、低レベルの $CD45RA$ を発現し、 $CD45R0$ もしくは $KLRG-1$ を発現しない；またはg) 高レベルの $CD62L$ 、低レベルの $CD44$ およびt-betを発現し、Sca-1 $^+$ である；ならびに／または中程度の $IL-2$ 産生能、低い $IFN\gamma$ 産生能、低い細胞傷害性および高い自己再生能を有することを含む。

20

【0458】

いくつかの態様において、培養T細胞中のT細胞サブセット（例えば、参照組成物または調製物と比較して培養T細胞において増加したT細胞サブセット）は、メモリーT細胞、例えば長寿命メモリーT細胞であるまたはそれらを含む。いくつかの態様において、メモリーT細胞は、セントラルメモリー (T_{CM}) T細胞である。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^-$ 、 $CD45R0^{low/+}$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD95^+$ $CD122^+$ および／または $KLGR1^{low}$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

30

【0459】

いくつかの態様において、メモリーT細胞は、幹セントラルメモリー (T_{SCM}) T細胞である。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^{low/+}$ 、 $CD45R0^{low/+}$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD95^+$ 、 $CD122^+$ および／または $KLGR1^-$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^{low/+}$ 、 $CD45R0^-$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD95^+$ 、 $CD122^+$ および／または $KLGR1^-$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45R0^-$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $IL-7R\alpha^+$ 、 $CD95^+$ 、 $IL-2R\beta^+$ 、 $CXCR3^+$ および／または $LFA-1^+$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ および／または $CD95^+$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^+$ 、 $CD45R0^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD95^+$ および／または $IL-2R\beta^+$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45R0^-$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD127^+$ および／または $CD95^+$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 $CD45RA^+$ 、 $CD44^{+/-}$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD127^+$ 、 $IL-2R\beta^+$ 、 $CD28^+$ 、 $CD43^-$ 、 $KLRG1^-$ 、パーフォリン $^-$ および／またはグランザイムB $^-$ の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、高レベルの $CCR7$ 、 $CD62L$ 、 $CD27$ および／または $CD28$ 、中程度のレベルの $CD95$ および／または $IL-2R\beta$ 、低レベルの $CD45RA$ を発現

40

50

し、ならびに／またはCD45ROおよび／またはKLRG-1を発現しない。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、高レベルのCD62L、低レベルのCD44およびt-betを発現し、ならびに／またはSca-1⁺である。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、中程度のIL-2産生能、低いIFN γ 産生能、低い細胞傷害性および／または高い自己再生能の表現型の特徴を有する。いくつかの態様において、培養T細胞中のそのようなT細胞のサブセットは、参照T細胞組成物または培養物中のT細胞のサブセットの数またはパーセンテージと比較して少なくとも約2倍（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上）増加する。

【0460】

いくつかの態様において、T細胞のサブセット、例えば上記のT細胞の任意のサブセットは、参照T細胞組成物もしくは調製物との比較で培養T細胞における総T細胞のうちのより高いパーセンテージまたは培養T細胞における総T細胞のうちのより多い数で存在する。いくつかの態様において、培養物中の総T細胞もしくは総細胞の中のパーセンテージとしての培養T細胞におけるT細胞サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。いくつかの態様において、培養細胞におけるT細胞サブセット、例えば上記の任意のT細胞サブセットのパーセンテージは、その表現型を有する1つまたは複数のマーカーの表面発現に基づきヒト対照から直接単離または濃縮されたがインキュベートまたは培養されていないT細胞組成物中のT細胞中の細胞のサブセットの対応するパーセンテージよりも高い、例えば少なくとも1.5倍高い、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍またはそれ以上高い。いくつかの態様において、培養細胞中のT細胞サブセット、例えば上記の任意のT細胞サブセットの総数、相対数または正規化された数は、参照T細胞組成物または調製物、例えば、上記の任意の参照T細胞組成物または調製物、例えば本明細書に提供される任意の方法にしたがう可逆的に結合された作用物質とのインキュベーション（例えば、多量体化作用物質、例えばオリゴマームテインストレプトアビジンに可逆的に結合された刺激物質とのインキュベーション）前のT細胞組成物におけるT細胞サブセットの数、相対数または正規化された数よりも多い、例えば少なくとも1.5倍多い、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍またはそれ以上多い。いくつかの態様において、T細胞培養物中に存在するT細胞サブセットに対応するT細胞の数は、少なくともまたは少なくとも約1x10⁶細胞、2x10⁶細胞、3x10⁶細胞、4x10⁶細胞、5x10⁶細胞またはそれ以上である。

【0461】

いくつかの態様において、T細胞サブセットは、CD62L+および／またはIL-7R α + (CD127+) であり、培養物中の総T細胞または総細胞のパーセンテージとしての培養T細胞におけるCD62L+および／またはIL-7R α + (CD127+) サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、CD45RA⁻、CD45RO^{low/+}および／またはKLRG1^{low}であり、培養物中の総T細胞または総細胞のパーセンテージとしての培養T細胞中のCD45RA⁻、CD45RO^{low/+}および／またはKLRG1^{low}サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。いくつかの態様において、T細胞サブセットは、CD45RA^{low/+}、CD45RO^{low/+}および／またはKLRG1⁻であり、培養物中の総T細胞または総細胞のパーセンテージとしての培養T細胞中のCD45RA^{low/+}、CD45RO^{low/+}および／またはKLRG1⁻サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。

【0462】

いくつかの態様において、T細胞サブセットは、T_{CM}細胞であるまたはT_{CM}細胞を含む。いくつかの態様において、培養物中の総T細胞または総細胞のパーセンテージとしての培養T細胞におけるT_{CM}サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。

【0463】

いくつかの態様において、T細胞サブセットは、 T_{SCM} 細胞であるまたは T_{SCM} 細胞を含む。いくつかの態様において、培養物中の総T細胞または総細胞のパーセンテージとしての培養T細胞における T_{SCM} サブセットのパーセンテージは、少なくとも35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上である。

【0464】

いくつかの態様において、T細胞のサブセット、例えばCD62L+ T細胞は、a) 低レベルのTCR再構成切除環 (TCR rearrangement excisions circles) (TREC) を有しもしくは示し；ならびに／またはb) 増殖マーカー (例えば、Ki-67) を発現し；ならびに／またはc) 刺激物質の存在下で増殖する能力を示し；ならびに／またはd) 刺激物質の存在下でIFN-ガンマ、TNFおよびIL-2から選択されるサイトカインを産生する能力を示し；ならびに／またはe) 刺激物質の非存在下で自然減しにくく；ならびに／またはf) T_{SCM} 、 T_{CM} 、 T_{EM} および T_{EFF} 細胞を生成することができ；ならびに／またはg) 低い細胞傷害性を有し；ならびに／またはh) T_{CM} もしくは T_{EM} 細胞を用いる場合よりも少ない細胞の養子移入後に同程度もしくはより大きな応答を生じ得る。いくつかの態様において、刺激物質は、抗原、恒常性サイトカイン (例えば、IL-15もしくはIL-17)、またはT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる作用物質である。いくつかの態様において、サイトカインを産生する能力は、低いIFN γ 産生能および中程度のIL-2産生能を有する。

【0465】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるようなインキュベート後に生成または生産され、参照T細胞組成物または調製物との比較で改変された機能的活性プロファイルにより特徴づけられる、例えば本明細書に提供される任意の方法にしたがい調製される、培養T細胞が提供される。いくつかの態様において、培養T細胞または培養物中に存在するT細胞の特定のサブセットは、参照組成物もしくは調製物と比較してまたは参照組成物もしくは調製物中のT細胞のサブセットと比較して変化した機能的活性プロファイル、例えば、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍変化 (例えば、増加または減少) した機能的活性、を示す。いくつかの態様において、機能的活性は、a) 低レベルのTCR再構成切除環 (TREC)；ならびに／またはb) 増殖マーカー (例えば、Ki-67) の発現；ならびに／またはc) 刺激物質の存在下での増殖能；ならびに／またはd) 刺激物質の存在下でのIFN-ガンマ、TNFおよびIL-2から選択されるサイトカインの産生能；ならびに／またはe) 刺激物質の非存在下での自然減のしにくさ；ならびに／またはf) T_{SCM} 、 T_{CM} 、 T_{EM} および T_{EFF} 細胞を生成することができること；ならびに／またはg) 低い細胞傷害性を有すること、の1つまたは複数から選択される。いくつかの態様において、作用物質は、抗原、恒常性サイトカイン (例えば、IL-15もしくはIL-17)、またはT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる作用物質である。いくつかの態様において、サイトカインを産生する能力は、低いIFN γ 産生能および中程度のIL-2産生能を含む。いくつかの態様において、T細胞のサブセットは、培養T細胞中のメモリーT細胞、例えば、長寿命メモリーT細胞を含む。いくつかの態様において、メモリーT細胞は、 T_{SCM} 細胞である。

【0466】

いくつかの態様において、培養T細胞または培養物中に存在するT細胞の特定のサブセットは、参照組成物もしくは調製物によってまたは参照組成物もしくは調製物中のT細胞のサブセットによって達成できるよりも少ない細胞の養子移入後に同程度またはより大きな応答を生じ得る。いくつかの態様において、そのような応答は、少なくとも約2倍 (例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上) 少ない細胞で達成される。いくつかの態様において、応答は、少なくとも約2倍 (例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍のいずれかまたはそれ以上) 増加するまたは大きい。

【0467】

いくつかの態様において、培養細胞におけるT細胞サブセット、例えば上記の任意のT細胞

10

20

30

40

50

胞サブセットのパーセンテージは、GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされたT細胞の調製物中の対応する細胞のサブセットよりも大きい、例えば、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍またはそれ以上大きい。いくつかの態様において、培養T細胞の組成物は、GSK-P阻害剤を含まない。

【0468】

いくつかの態様において、培養細胞におけるT細胞サブセット、例えば上記の任意のT細胞サブセットのパーセンテージは、組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7またはIL-15の存在下でインキュベートされた対応する細胞のサブセットよりも大きい、例えば、少なくとも1.5倍大きい、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍またはそれ以上大きい。いくつかの態様において、培養T細胞の組成物は、組換え（例えば、外因性）IL-7サイトカインまたは組換え（例えば、外因性）IL-15サイトカインを含まない。

10

【0469】

いくつかの態様において、培養T細胞の組成物は、刺激物質または物質群のシグナルを妨害、例えば減少および／または停止させるためにT細胞に物質、例えば競合物質が添加された、本明細書に提供される任意の方法にしたがい生産または生成されたものである。いくつかの態様において、培養T細胞の組成物は、物質、例えば競合物質、例えばビオチンまたはビオチン類似体、例えばD-ビオチンの存在を含む。いくつかの態様において、物質、例えば競合物質、例えばビオチンまたはビオチン類似体、例えばD-ビオチンは、培養T細胞の参照組成物または調製物における物質の量よりも少なくとも1.5倍多い、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍またはそれ以上多い量で存在し、物質はインキュベーションの間に外部から添加されなかった。いくつかの態様において、培養T細胞の組成物における物質、例えば競合物質、例えばビオチンまたはビオチン類似体、例えばD-ビオチンの量は、 $10\ \mu\text{M}\sim 100\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、 $100\ \mu\text{M}\sim 500\ \mu\text{M}$ もしくは $10\ \mu\text{M}\sim 100\ \mu\text{M}$ または約 $10\ \mu\text{M}\sim 100\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、 $100\ \mu\text{M}\sim 500\ \mu\text{M}$ もしくは $10\ \mu\text{M}\sim 100\ \mu\text{M}$ である。

20

【0470】

IV. 培養細胞を遺伝子操作する方法、抗原受容体、および遺伝子操作された細胞

いくつかの態様において、培養細胞は、操作された受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）などの操作された抗原受容体を含有するか、または含有するように操作される。そのような細胞の集団、T細胞またはCD8+細胞もしくはCD4+細胞などのある特定の型の細胞が濃縮または選択されているような、そのような細胞を含有するおよび／またはそのような細胞について濃縮された組成物もまた提供される。組成物には、薬学的組成物、および養子細胞療法などのための投与用の製剤が含まれる。対象、例えば患者に、細胞および組成物を投与する治療法もまた提供される。

30

【0471】

したがって、いくつかの態様において、培養細胞は、遺伝子操作により導入された1種または複数種の核酸を含み、それによってそのような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。いくつかの態様において、遺伝子導入は、例えばサイトカインまたは活性化マーカーの発現によって測定される増殖、生存、および／または活性化などの応答を誘導する刺激剤と培養細胞を混合することなどによって、最初に培養細胞を刺激し、続いて活性化細胞の形質導入、および臨床適用に十分な数への培養中での増大を行うことによって達成される。

40

【0472】

状況によっては、刺激因子（例えば、リンホカインまたはサイトカイン）の過剰発現は対象にとって毒性がある場合がある。したがって、状況によっては、操作された細胞は、養子免疫療法における投与時などに、細胞がインビボで陰性選択を受け得るようにする遺伝子セグメントを含む。例えば、いくつかの局面において、培養細胞は、それらが投与された患者のインビボ状態における変化の結果として排除され得るように操作される。陰性選択可能な表現型は、投与される薬剤、例えば化合物に対する感受性を付与する遺伝子の

50

挿入に起因し得る。陰性選択可能な遺伝子には、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ (HSV-I TK) 遺伝子 (Wigler et al., Cell 2: 223, 1977) ; 細胞ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子、細胞アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 遺伝子、細菌シトシンデアミナーゼ (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)) が含まれる。いくつかの局面において、培養細胞は、サイトカインまたは他の因子の発現を促進するようにさらに操作される。

【0473】

A. 抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体をコードする核酸

遺伝子操作された細胞を生成するための方法、核酸、組成物、およびキットが提供される。遺伝子操作は一般に、レトロウイルス形質導入、トランスフェクション、または形質転換などによる、組換え構成成分または操作された構成成分をコードする核酸の、培養細胞を含有する組成物への導入を含む。

【0474】

いくつかの態様において、核酸は異種であり、すなわち細胞中または細胞から得られた試料中に通常は存在せず、例えば別の生物または細胞から得られるものであり、これは例えば操作される細胞および／またはそのような細胞の由来元の生物には通常は見出されない。いくつかの態様において、核酸は天然に存在せず、例えば自然界には見出されない核酸などであり、これには複数の異なる細胞型からの様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含むものが含まれる。

【0475】

1. キメラ抗原受容体 (CAR)

細胞は一般に、組換え受容体、例えば抗原受容体などを発現し、これには機能的非TCR抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体 (CAR)、および他の抗原結合受容体、例えばトランスジェニックT細胞受容体 (TCR) などが含まれる。受容体には、他のキメラ受容体もまた含まれる。

【0476】

CARを含む例示的な抗原受容体、およびそのような受容体を操作し細胞に導入する方法には、例えば、国際特許出願公開W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061、米国特許出願公開番号US2002131960、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、第7,446,190号、第8,252,592号、第8,339,645号、第8,398,282号、第7,446,179号、第6,410,319号、第7,070,995号、第7,265,209号、第7,354,762号、第7,446,191号、第8,324,353号、および第8,479,118号、ならびに欧州特許出願番号EP2537416に記載されているもの、ならびに／またはSadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75によって記載されているものが含まれる。いくつかの局面において、抗原受容体には、米国特許第7,446,190号に記載されているCAR、および国際特許出願公開W0/2014055668 A1に記載されているものが含まれる。CARの例には、W02014031687、US8,339,645、US7,446,179、US2013/0149337、米国特許第7,446,190号、米国特許第8,389,282号、Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; およびBrentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177) などの、上述の刊行物のいずれかに開示されているCARが含まれる。W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、米国特許第7,446,190号、および米国特許第8,389,282号もまた参照されたい。CARなどのキメラ受容体は一般に、細胞外抗原結合ドメイン、例えば抗体分子の一部など、一般的には抗体の可変重 (V_H) 鎖領域および／または可変軽 (V_L) 鎖領域、例えばscFv抗体断片を含む。

【0477】

いくつかの態様において、受容体によって標的とされる抗原はポリペプチドである。い

10

20

30

40

50

くつかの態様において、それは糖質または他の分子である。いくつかの態様において、抗原は、正常なまたは標的とされない細胞または組織と比較して、疾患または状態の細胞、例えば腫瘍細胞または病原性細胞上で選択的に発現されるかまたは過剰発現される。他の態様において、抗原は正常細胞上で発現される、および/または操作された細胞上で発現される。

【0478】

受容体によって標的とされる抗原には、いくつかの態様において、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3、もしくは4、FBP、胎児アセチルコリン (acetylcholine) 受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、リースY、L1-細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、がん胎児性抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、がん胎児抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、c-Met、GD-2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT-1)、サイクリン、例えばサイクリンA1 (CCNA1) など、ならびに/またはビオチン化分子、ならびに/またはHIV、HCV、HBV、もしくは他の病原体によって発現される分子が含まれる。

【0479】

いくつかの態様において、CARは病原体特異的抗原と結合する。いくつかの態様において、CARは、ウイルス抗原 (例えばHIV、HCV、HBV等)、細菌抗原、および/または寄生生物抗原に特異的である。

【0480】

いくつかの態様において、組換え受容体、例えばCARの抗体部分は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部、例えば、ヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域、ならびに/またはCH1/CLおよび/もしくはFc領域などを含む。いくつかの態様において、定常領域または部分は、IgG4またはIgG1などのヒトIgGのものである。いくつかの局面において、定常領域の一部は、抗原認識構成成分、例えばscFvと膜貫通ドメインとの間のスペーサー領域として役立つ。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して、抗原結合後の細胞の応答性を増加させる長さのものであってよい。例示的なスペーサー、例えばヒンジ領域には、国際特許出願公開W02014031687に記載されているものが含まれる。いくつかの例において、スペーサーは、12アミノ酸長もしくは約12アミノ酸長または12アミノ酸長以下である。例示的なスペーサーには、少なくとも約10~229アミノ酸、約10~200アミノ酸、約10~175アミノ酸、約10~150アミノ酸、約10~125アミノ酸、約10~100アミノ酸、約10~75アミノ酸、約10~50アミノ酸、約10~40アミノ酸、約10~30アミノ酸、約10~20アミノ酸、または約10~15アミノ酸 (列挙された範囲の任意の端点間の任意の整数を含む) を有するものが含まれる。いくつかの態様において、スペーサー領域は約12個以下のアミノ酸、約119個以下のアミノ酸、または約229個以下のアミノ酸を有する。例示的なスペーサーは、IgG4ヒンジのみ、CH2およびCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジを含む。

【0481】

この抗原認識ドメインは一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分、例えば、CARの場合であればTCR複合体などの抗原受容体複合体を介する活性化を模倣し、かつ/または別の細胞表面受容体を通してシグナル伝達するシグナル伝達構成成分などに、連結される。したがって、いくつかの態様において、抗原結合構成成分 (例えば、抗体) は、1つまたは複数の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは細胞外ドメインに融合される。1つの態様では、受容体、例えばCAR中のドメインの1つに天然で付随している膜貫通ドメインが使用される。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのそのようなドメインの結合を回避するように選択され、またはアミノ酸置換によって修飾される。

【0482】

膜貫通ドメインはいくつかの態様において、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然である場合、ドメインはいくつかの局面において、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域には、T細胞受容体のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、および／またはCD154に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域を含む）ものが含まれる。あるいは、膜貫通ドメインはいくつかの態様において合成による。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインは、主に、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含む。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインの各末端には、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが見出されるであろう。いくつかの態様において、連結はリンカー、スペーサー、および／または膜貫通ドメインによる。

10

【0483】

細胞内シグナル伝達ドメインには、天然抗原受容体を介するシグナル、共刺激受容体と組み合わされたそのような受容体を介するシグナル、および／または共刺激受容体のみを介するシグナルを模倣するか、またはそれらに近似するものが含まれる。いくつかの態様では、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば2～10アミノ酸長のリンカー、例えばグリシンおよびセリン（例えば、グリシン-セリンダブルレット）を含有するものなどが存在し、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成する。

20

【0484】

受容体、例えばCARは、一般に、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達構成成分または細胞内シグナル伝達構成成分群を含む。いくつかの態様において、受容体は、TCR複合体の細胞内構成成分、例えばT細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖など、例えばCD3ゼータ鎖を含む。したがって、いくつかの局面において、抗原結合部分は1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。いくつかの態様において、細胞シグナル伝達モジュールは、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および／または他のCD膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、受容体、例えばCARは、Fc受容体 γ 、CD8、CD4、CD25、またはCD16などの1つまたは複数の付加的な分子の一部をさらに含む。例えば、いくつかの局面において、CARまたは他のキメラ受容体は、CD3-ゼータ (CD3- ζ) またはFc受容体 γ とCD8、CD4、CD25、またはCD16とのキメラ分子を含む。

30

【0485】

いくつかの態様では、CARまたは他のキメラ受容体の連結時に、受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えばCARを発現するように操作されたT細胞、の正常なエフェクター機能または応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、状況によっては、CARは、細胞溶解活性またはTヘルパー活性などといったT細胞の機能、例えばサイトカインまたは他の因子の分泌などを誘導する。いくつかの態様では、例えば、抗原受容体構成成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断された部分が、エフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、インタクトな免疫刺激鎖の代わりにそれが使用される。いくつかの態様において、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体 (TCR) の細胞質配列を含み、いくつかの局面では、天然状況においてそのような受容体と協調して作用して、抗原受容体会合後にシグナル伝達を開始させる、共受容体の細胞質配列も、含む。

40

【0486】

天然のTCRの状況において、完全な活性化は一般に、TCRを介するシグナル伝達のみならず、共刺激シグナルも必要とする。したがって、いくつかの態様では、完全な活性化を促進するために、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための構成成分もまたCARに含まれる。他の態様において、CARは、共刺激シグナルを生成するための構成成分を含まない。いくつかの局面では、同じ細胞中で付加的なCARが発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための構成成分を提供する。

50

【0487】

T細胞活性化は、いくつかの局面において、2つのクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを介する抗原依存性一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）；および抗原非依存的様式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されると説明される。いくつかの局面において、CARは、そのようなシグナル伝達構成成分の一方または両方を含む。

【0488】

いくつかの局面において、CARは、TCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有し得る。ITAM含有一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CDS、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれる。いくつかの態様において、CAR中の細胞質シグナル伝達分子は、CD3ゼータ由来の、細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、または配列を含有する。

10

【0489】

いくつかの態様において、CARは、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、およびICOSなどの共刺激受容体のシグナル伝達ドメインおよび／または膜貫通部分を含む。いくつかの局面では、同じCARが活性化構成成分と共刺激構成成分の両方を含む。

【0490】

いくつかの態様では、活性化ドメインが1つのCAR内に含まれる一方で、共刺激構成成分は、別の抗原を認識する別のCARによって提供される。いくつかの態様において、CARは、いずれも同じ細胞上に発現される活性化または刺激CAR、共刺激CARを含む（WO2014/055668を参照されたい）。いくつかの局面において、細胞は、1種または複数種の刺激または活性化CARおよび／または共刺激CARを含む。いくつかの態様において、細胞は、疾患または状態と関連し、かつ／またはそれに特異的な抗原以外の抗原を認識するCARなどの阻害性CAR（iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) を参照されたい）をさらに含み、それによって、疾患標的CARを介して送達される活性化シグナルは、阻害性CARがそのリガンドに結合することにより削減または阻害されて、例えばオフターゲット効果を減少させる。

20

【0491】

ある特定の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3（例えば、CD3-ゼータ）細胞内ドメインに連結されたCD28膜貫通およびシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ細胞内ドメインに連結されたキメラCD28およびCD137（4-1BB、TNFRSF9）共刺激ドメインを含む。

30

【0492】

いくつかの態様において、CARは、細胞質部分において、1つまたは複数の、例えば2つまたはそれ以上の、共刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば一次活性化ドメインを包含する。例示的なCARは、CD3-ゼータ、CD28、および4-1BBの細胞内構成成分を含む。

【0493】

いくつかの態様において、CARまたは他の抗原受容体は、受容体を発現させるための細胞の形質導入または操作を確認するために使用され得るマーカー、例えば細胞表面マーカーなど、例えば切断型の細胞表面受容体など、例えば切断型EGFR（tEGFR）などを、さらに含む。いくつかの局面において、マーカーは、CD34、NGFR、または上皮成長因子受容体（例えば、tEGFR）のすべてまたは一部（例えば、切断型）を含む。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えばT2Aなどの切断可能リンカー配列をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結される。WO2014031687を参照されたい。

40

【0494】

いくつかの態様において、マーカーは、T細胞上に天然には見出されないまたはT細胞の表面上に天然には見出されない分子、例えば細胞表面タンパク質、またはその一部である

50

。

【0495】

いくつかの態様において、分子は非自己分子、例えば非自己タンパク質、すなわち細胞が養子移入される宿主の免疫系によって「自己」と認識されないものである。

【0496】

いくつかの態様において、マーカーは、治療的機能を果たさず、かつ／または遺伝子操作のためのマーカー、例えばうまく操作された細胞を選択するためのマーカーとして使用されること以外の効果をもたらさない。他の態様において、マーカーは治療分子、またはその他の方法で何らかの所望の効果を発揮する分子であってよく、例えばインビボで遭遇する細胞のリガンドなど、例えば養子移入およびリガンドとの遭遇時に細胞の応答を増強するおよび／または減衰させるための共刺激分子または免疫チェックポイント分子などであってよい。

【0497】

場合により、CARは、第1世代CAR、第2世代CAR、および／または第3世代CARと称される。いくつかの局面において、第1世代CARは、抗原結合時にCD3鎖誘導性シグナルを単に提供するものであり；いくつかの局面において、第2世代CARは、そのようなシグナルおよび共刺激シグナルを提供するもの、例えばCD28またはCD137などの共刺激受容体からの細胞内シグナリングドメインを含むものであり；いくつかの局面において、第3世代CARは、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むものである。

【0498】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、抗体または抗体断片を含有する細胞外部分を含む。いくつかの局面において、キメラ抗原受容体は、抗体または断片を含有する細胞外部分、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、抗体または断片はscFvを含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインを含む。いくつかの局面において、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通部分を含有する。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子はCD28または41BBである。

【0499】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、互換的に使用されてアミノ酸残基のポリマーを指し、最小限の長さに限定されない。提供される受容体および他のポリペプチド、例えばリンカーまたはペプチドを含むポリペプチドは、天然および／または非天然アミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含み得る。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、およびリン酸化も含む。いくつかの局面において、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、ネイティブまたは天然配列に対する修飾を含有し得る。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によるように、意図的である場合もあるし、またはタンパク質を産生する宿主の突然変異もしくはPCR増幅に起因するエラーによるなど、偶発的である場合もある。

【0500】

いくつかの態様において、連続用量中の細胞によって発現される受容体、例えばCARは、第1の用量の細胞によって発現される受容体、例えばCARのように、少なくとも1つの免疫反応性エпитープを含有する。いくつかの局面において、連続用量で投与される細胞によって発現される受容体、例えばCARは、第1の用量によって発現される受容体、例えばCARと同一であるか、または第1の用量で投与される細胞によって発現される受容体、例えばCARと実質的に同一である。

【0501】

様々な用量で対象に投与される細胞によって発現される組換え受容体、例えばCARは、一般に、処置される疾患もしくは状態またはその細胞において発現される、それと関連し

10

20

30

40

50

た、および／またはそれに特異的な分子を認識するか、またはそれに特異的に結合する。分子、例えば抗原、に特異的に結合すると、受容体は一般に、ITAMによって伝達されるシグナルなどの免疫賦活性シグナルを細胞に送達し、それによって疾患または状態を標的とする免疫応答を促進する。例えば、いくつかの態様において、第1の用量中の細胞は、疾患もしくは状態の細胞もしくは組織によって発現されるか、または疾患もしくは状態と関連した抗原に特異的に結合するCARを発現する。

【0502】

2. TCR

いくつかの態様において、遺伝子操作された抗原受容体には、組換えT細胞受容体 (TCR) および／または天然に存在するT細胞からクローニングされたTCRが含まれる。いくつかの態様では、標的抗原 (例えば、がん抗原) に対する高親和性T細胞クローンが、同定され、患者から単離され、細胞に導入される。いくつかの態様において、標的抗原に対するTCRクローンは、ヒト免疫系遺伝子 (例えば、ヒト白血球抗原系またはHLA) を用いて操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製されている。例えば、腫瘍抗原を参照されたい (例えば、Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180およびCohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808を参照されたい)。いくつかの態様では、標的抗原に対するTCRを単離するために、ファージディスプレイが使用される (例えば、Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395およびLi (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354を参照されたい)。

【0503】

いくつかの態様では、T細胞クローンが得られた後、TCRアルファ鎖およびベータ鎖が単離され、遺伝子発現ベクターにクローニングされる。いくつかの態様において、TCRアルファ遺伝子およびベータ遺伝子は、両鎖が同時発現されるように、ピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドを通じて連結される。いくつかの態様において、TCRの遺伝子導入は、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターによって、またはトランスポゾンによって達成される (例えば、Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; およびHackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683を参照されたい)。

【0504】

3. マルチターゲットティング

いくつかの態様において、細胞および方法は、それぞれが同じまたは異なる抗原を認識し、典型的にはそれぞれが異なる細胞内シグナル伝達構成成分を含む、2種またはそれ以上の遺伝子操作された受容体を細胞上に発現させるなどのマルチターゲットティング戦略を含む。そのようなマルチターゲットティング戦略は、例えば、国際特許出願公開WO2014055668 A1 (例えば、オフターゲット細胞、例えば正常細胞上には個々に存在するが、処置されるべき疾患または状態の細胞上にのみ共に存在する2種類の異なる抗原を標的とする、活性化CARと共刺激CARとの組み合わせを記載している)、およびFedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) (活性化CARおよび阻害性CARを発現する細胞、例えば、活性化CARが、正常細胞または非罹患細胞と処置されるべき疾患または状態の細胞との両方に発現されるある抗原に結合し、阻害性CARが、正常細胞または処置が望ましくない細胞にのみ発現される別の抗原に結合する細胞などを記載している) に記載されている。

【0505】

例えば、いくつかの態様において、細胞は、一般的に、第1受容体によって認識される抗原、例えば第1抗原に特異的に結合した際に、細胞に対して活性化シグナルを誘導することができる第1の遺伝子操作された抗原受容体 (例えば、CARまたはTCR) を発現する受容体を含む。いくつかの態様において、細胞は、一般的に、第2受容体によって認識される第2抗原に特異的に結合した際に、免疫細胞に対して共刺激シグナルを誘導することが

できる第2の遺伝子操作された抗原受容体（例えば、CARまたはTCR）、例えばキメラ共刺激受容体をさらに含む。いくつかの態様において、第1抗原と第2抗原は同じである。いくつかの態様において、第1抗原と第2抗原は異なる。

【0506】

いくつかの態様において、第1および／または第2の遺伝子操作された抗原受容体（例えば、CARまたはTCR）は、細胞に対して活性化シグナルを誘導することができる。いくつかの態様において、受容体は、ITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達構成成分を含む。いくつかの態様において、第1受容体によって誘導される活性化は、免疫応答の開始をもたらす、細胞におけるシグナル伝達またはタンパク質発現の変化、例えばITAMリン酸化および／もしくはITAM媒介性シグナル伝達カスケードの開始など、免疫シナプスの形成および／もしくは結合した受容体の近傍での分子（例えば、CD4もしくはCD8等）のクラスター化、1種もしくは複数種の転写因子、例えばNF- κ Bおよび／もしくはAP-1などの活性化、ならびに／またはサイトカインなどの因子の遺伝子発現の誘導、増殖、および／もしくは生存を伴う。

10

【0507】

いくつかの態様において、第1および／または第2受容体は、CD28、CD137（4-1 BB）、OX40、および／またはICOSなどの共刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、第1および2受容体は、異なる共刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。1つの態様において、第1受容体はCD28共刺激シグナル伝達領域を含有し、第2受容体は4-1BB共刺激シグナル伝達領域を含有し、またはその逆である。

20

【0508】

いくつかの態様において、第1および／または第2受容体は、ITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインの両方を含む。

【0509】

いくつかの態様において、第1受容体はITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有し、第2受容体は共刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。同じ細胞内での活性化シグナルと共刺激シグナルとの組み合わせは、免疫応答、例えば強力でかつ持続的な免疫応答など、例えば、遺伝子発現の増加、サイトカインおよび他の因子の分泌、ならびに細胞死滅などのT細胞媒介性エフェクター機能などをもたらすものである。

30

【0510】

いくつかの態様において、第1受容体のみの連結によっても第2受容体のみの連結によっても、強力な免疫応答は誘導されない。いくつかの局面において、一方の受容体のみが連結された場合には、細胞は寛容化する、もしくは抗原に対して応答しなくなる、または阻害される、および／または増殖するように、もしくは因子を分泌するように、もしくはエフェクター機能を実行するように誘導されない。しかしながら、いくつかのそのような態様において、第1抗原および第2抗原を発現する細胞に遭遇した際など、複数の受容体が連結された場合には、例えば、1種もしくは複数種のサイトカインの分泌、増殖、持続、および／または標的細胞の細胞傷害性死滅などの免疫エフェクター機能の実行によって示されるような、完全な免疫活性化または刺激などの望ましい応答が達成される。

40

【0511】

いくつかの態様において、2種類の受容体はそれぞれ、受容体の一方がその抗原に結合することで細胞が活性化されるかまたは応答が誘導され、第2の阻害性受容体はその抗原に結合することで、その応答を抑制するかまたは減衰させるシグナルが誘導されるように、細胞に対して活性化シグナルおよび阻害シグナルを誘導する。例として、活性化CARと阻害性CARまたはiCARとの組み合わせがある。このような戦略を使用することができ、例えばこの場合、活性化CARは、疾患または状態において発現されるが、正常細胞上でも発現される抗原と結合し、阻害性受容体は、正常細胞上で発現されるが、疾患または状態の細胞上では発現されない別の抗原に結合する。

50

【0512】

いくつかの態様において、特定の疾患または状態と関連した抗原が、一過性に（例えば、遺伝子操作と関連した刺激時に）または恒久的に非罹患細胞上で発現され、かつ／または操作された細胞自体において発現される場合に、マルチターゲティング戦略が用いられる。そのような場合、2つの別々の、かつ個々に特異的な抗原受容体の連結を必要とすることによって、特異性、選択性、および／または有効性が改善され得る。

【0513】

いくつかの態様において、複数種の抗原、例えば第1抗原および第2抗原は、標的とされる細胞、組織、または疾患もしくは状態において、例えばがん細胞などにおいて発現される。いくつかの局面において、細胞、組織、疾患、または状態は多発性骨髄腫または多発性骨髄腫細胞である。いくつかの態様において、複数種の抗原のうちの1種または複数種は一般に、細胞療法で標的とすることが望ましくない細胞、例えば正常なもしくは非罹患の細胞もしくは組織、および／または操作された細胞自体においても発現される。そのような態様では、細胞の応答を達成するために複数種の受容体の連結を必要とすることによって、特異性および／または有効性が達成される。

10

【0514】

B. ベクターおよび遺伝子操作の方法

遺伝子操作された構成成分、例えば抗原受容体、例えばCARまたはTCRを導入するための様々な方法が周知であり、提供される方法および組成物と共に使用され得る。例示的な方法には、ウイルス、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、およびエレクトロポレーションによるものを含む、受容体をコードする核酸を導入するための方法が含まれる。

20

【0515】

いくつかの態様において、組換え核酸は、例えばシミアンウイルス40 (SV40)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) 由来のベクターなどの組換え感染性ウイルス粒子を用いて、培養細胞に導入される。いくつかの態様において、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えばガンマ-レトロウイルスベクターなどを用いて、T細胞に導入される（例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 20 14 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 113 7-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557を参照されたい）。

30

【0516】

いくつかの態様において、レトロウイルスベクター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス (SFFV)、またはアデノ随伴ウイルス (AAV) 由来のレトロウイルスベクターは、長い末端反復配列 (LTR) を有する。大部分のレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスに由来する。いくつかの態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類細胞または哺乳動物細胞供給源に由来するものが含まれる。レトロウイルスは典型的に広宿主性であり、広宿主性とは、それらが、ヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染する能力を有することを意味する。1つの態様では、発現されるべき遺伝子でレトロウイルスの gag、pol、および／または env 配列を置き換える。実例となるレトロウイルス系がいくつか記載されている（例えば、米国特許第5,219,740号；第6,207,453号；第5,219,740号；Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7: 980-990；Miller, A.D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14；Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852；Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037；および Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109）。

40

【0517】

レンチウイルス形質導入の方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701；Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644；Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506:97-114；および Cavalieri et al. (

50

2003) Blood. 102(2): 497-505に記載されている。

【0518】

いくつかの態様において、組換え核酸は、エレクトロポレーションによってT細胞に導入される（例えば、Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298、およびVan Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437を参照されたい）。いくつかの態様において、組換え核酸は、転位によってT細胞に導入される（例えば、Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; およびHuang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126を参照されたい）。免疫細胞に遺伝物質を導入し発現させる他の方法には、（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されているような）リン酸カルシウムトランスフェクション、プロトプラスト融合、カチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション；タングステン粒子促進性微粒子銃（Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)）、およびリン酸ストロンチウムDNA共沈殿（Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)）が含まれる。

10

【0519】

組換え産物をコードする核酸を導入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば国際特許出願公開W02014055668および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0520】

いくつかの態様では、増大中または増大後のいずれかに、細胞、例えばT細胞に、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をトランスフェクトしてもよい。所望の受容体の遺伝子を導入するためのこのトランスフェクションは、例えば任意の適切なレトロウイルスベクターを用いて行うことができる。次いで、遺伝子改変された細胞集団を初期刺激（例えば、CD3/CD28刺激）から解放し、その後、例えば新規に導入された受容体を通して第2の型の刺激で刺激することができる。この第2の型の刺激は、ペプチド/MHC分子、遺伝子導入された受容体の同族（架橋）リガンド（例えば、CARの天然リガンド）、または（例えば、受容体内の定常領域を認識することにより）新たな受容体のフレームワーク内に直接結合する任意のリガンド（抗体など）の形態の抗原刺激を含み得る。例えば、Cheadle et al, 「Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy」 Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66またはBarrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014) を参照されたい。

20

30

【0521】

付加的な核酸、例えば導入するための遺伝子には、移植された細胞の生存度および／または機能を促進することなどによって、治療の有効性を改善するためのもの；インビボでの生存または局在性を評価するためなどの、細胞の選択および／または評価のための遺伝子マーカーを提供するための遺伝子；例えば、Lupton S.D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)；およびRiddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992) に記載されているように、細胞がインビボで陰性選択を受け得るようにすることによって、安全性を改善するための遺伝子が含まれる。優性陽性選択可能マーカーを陰性選択可能マーカーと融合することによって得られる二機能性選択可能融合遺伝子の使用を記載している、LuptonらによるPCT/US91/08442およびPCT/US94/05601の刊行物もまた参照されたい。例えば、Riddellらの米国特許第6,040,177号の第14～17欄を参照されたい。

40

【0522】

いくつかの例においては、細胞、例えばT細胞が活性化されることを必要としないベクターが使用され得る。そのような場合には、細胞は、活性化の前に選択および／または形質導入され得る。したがって、本明細書に記載されるような細胞の培養の前または後に、および場合によっては培養の少なくとも一部と同時にもしくはその最中に、細胞を操作することができる。いくつかの態様において、操作されるべき細胞は培養細胞であり、または場合によっては、本明細書に記載されるような培養を行う前に細胞に形質導入することができる。

50

【0523】

V. 組成物、製剤、および投与方法

操作された受容体（例えば、操作された抗原受容体）、例えばCARまたはTCRを含有する組成物、ならびに、操作された細胞を含有する組成物例えば薬学的組成物および製剤、もまた提供される。本明細書で提供される方法のいずれかによって生成される複数の培養T細胞または標的細胞、および任意で薬学的に許容される賦形剤を含有する組成物もまた提供される。抗原が発現される疾患、状態、および障害の処置における、または検出、診断、および予後診断方法におけるような、組成物の使用方法およびその使用もまた提供される。

【0524】

10

A. 組成物／製剤

「薬学的製剤」という用語は、その中に含有される活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であって、かつその製剤が投与される対象にとって容認できないほどの毒性がある付加的な構成成分を含有しない調製物を指す。

【0525】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0526】

いくつかの局面において、担体の選択は、一部には、特定の細胞によって、および／または投与方法によって決まる。したがって、種々の適切な製剤が存在する。例えば、薬学的組成物は保存剤を含有し得る。適切な保存剤には、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが含まれ得る。いくつかの局面では、2種またはそれ以上の保存剤の混合物が使用される。保存剤またはその混合物は典型的に、組成物全体の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) によって記載されている。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度において一般に受容者にとって非毒性であり、これには、緩衝剤、例えばリン酸、クエン酸、および他の有機酸など；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニンを含む；保存剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンなど；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなど；単糖、二糖、および他の糖質、例えばグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む；キレート剤、例えばEDTAなど；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなど；塩形成対イオン、例えばナトリウムなど；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびに／または非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）などが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0527】

いくつかの局面では、緩衝物質が組成物中に含まれる。適切な緩衝物質には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。いくつかの局面では、2種またはそれ以上の緩衝物質の混合物が使用される。緩衝物質またはその混合物は典型的に、組成物全体の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製する方法は公知である。例示的な方法は、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005) に詳述されている。

【0528】

50

製剤または組成物は、細胞で処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な2種以上の活性成分、好ましくは細胞を補完する活性を有し、それぞれの活性が互いに有害な影響を及ぼさないものもまた含有し得る。そのような活性成分は、意図される目的に有効な量の組み合わせで適切に存在する。したがって、いくつかの態様において、薬学的組成物は、他の薬学的に活性のある作用物質または薬物、例えば化学療法剤など、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチン等をさらに含む。いくつかの態様において、細胞または抗体は、塩、例えば薬学的に許容される塩の形態で投与される。薬学的に許容される適切な酸付加塩には、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸、および硫酸などの鉱酸、ならびに酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、およびアリアルスルホン酸、例えばp-トルエンスルホン酸などの有機酸から誘導されるものが含まれる。

10

【0529】

活性成分は、マイクロカプセル、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。ある特定の態様において、薬学的組成物は、シクロデキストリン包接複合体などの包接複合体として、またはリポソームとして製剤化される。リポソームは、宿主細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）が特定組織を標的とするのに役立ち得る。リポソームの調製には、例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)、ならびに米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号、および第5,019,369号に記載されているものなど、多くの方法を利用することができる。

20

【0530】

薬学的組成物はいくつかの局面において、組成物の送達、処置されるべき部位の感作の前に、その感作を引き起こすのに十分な時間起こるように、持続放出型、遅延放出型、および徐放型の送達系を使用し得る。多くの型の放出送達系が利用可能であり、それらは公知である。そのような系は、組成物の反復投与を回避し、それによって対象および医師の利便性を高め得る。

【0531】

薬学的組成物はいくつかの態様において、治療有効量または予防有効量などの、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量で細胞を含有する。治療有効性または予防有効性はいくつかの態様において、処置された対象の定期評価によってモニターされる。状態に応じた数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、処置は、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで繰り返される。しかしながら、他の投与計画が有用である場合もあり、それが決定され得る。望ましい投薬量は、組成物の単回ボラス投与によって、組成物の複数回ボラス投与によって、または組成物の持続注入投与によって送達され得る。

30

【0532】

細胞は、標準的な投与技法、製剤、および／または装置を用いて投与され得る。組成物の貯蔵および投与のための、シリンジおよびバイアルなどの製剤および装置が提供される。細胞の投与は、自家投与または異種投与であってよい。例えば、ある対象から免疫応答細胞または前駆細胞を入手し、同じ対象または異なる適合対象に投与することができる。末梢血由来免疫応答細胞またはそれらの子孫（例えば、インビボ、エキスビボ、またはインビトロで得られる）は、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与によって投与することができる。治療用組成物（例えば、遺伝子改変された免疫応答細胞を含有する薬学的組成物）を投与する場合、治療用組成物は一般に注射可能な単位剤形（溶液、懸濁液、エマルジョン）で製剤化される。

40

【0533】

製剤には、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、頬側投与、舌下投与、または坐剤投与用のものが含まれる。いくつか

50

の態様において、細胞集団は非経口投与される。本明細書で用いられる「非経口」という用語は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔投与、および腹腔内投与を含む。いくつかの態様において、細胞集団は、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による末梢全身送達を用いて対象に投与される。

【0534】

組成物はいくつかの態様において、無菌液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルション、分散液、または粘性組成物として提供され、それらはいくつかの局面において、選択されたpHに緩衝化され得る。液体調製物は通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物よりも調製が容易である。加えて、液体組成物の方が、投与するのに、特に注射によって投与するのにいくらか便利である。一方、粘性組成物は、特定組織とのより長い接触期間を提供するために、適切な粘性範囲内で製剤化され得る。液体組成物または粘性組成物は担体を含んでよく、担体は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。

10

【0535】

無菌注射溶液は、細胞を溶媒中に組み入れて、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロース、または同様のものなどの適切な担体、希釈剤、または賦形剤と混合するなどして調製され得る。組成物はまた凍結乾燥され得る。組成物は、投与経路および所望の調製物に応じて、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝物質、ゲル化または増粘性添加剤、保存剤、香味剤、着色剤、および同様のものなどの補助物質を含有し得る。いくつかの局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教本を参照することができる。

20

【0536】

抗菌性保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌性を増加させる様々な添加剤が添加され得る。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、および同様のものによって保証され得る。注射可能な薬学的形態の長期吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0537】

徐放性調製物を調製することもできる。徐放性調製物の適切な例には、造形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態をした、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスが含まれる。

30

【0538】

インビボ投与に使用されるべき製剤は一般に無菌である。無菌性は、例えば無菌濾過膜を介する濾過などによって容易に達成され得る。

【0539】

B. 投与方法

細胞、集団、および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態、および障害を処置または予防するためのそのような細胞、集団、および組成物の使用が提供される。いくつかの態様では、細胞、集団、および組成物が、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法によって、処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象または患者に投与される。いくつかの態様では、操作された組成物ならびにインキュベーションおよび／または他の加工段階の後の生成終了組成物などの、提供される方法によって調製された細胞および組成物が、疾患もしくは状態を有するかまたはそれらのリスクがある対象などの対象に投与される。いくつかの局面において、本方法はそれにより、操作されたT細胞によって認識される抗原を発現するがんにおける腫瘍量を減らすことなどによって、疾患または状態の1つまたは複数の症状を処置する、例えば改善する。

40

【0540】

養子細胞療法のために細胞を投与する方法は公知であり、提供される方法および組成物

50

と関連して使用され得る。例えば、養子T細胞療法は、例えば、Gruenberg et alの米国特許出願公開番号2003/0170238；Rosenbergの米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85に記載されている。例えば、Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933；Tsukahara et al.(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9；Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338を参照されたい。

【0541】

本明細書で用いられる場合、「対象」は、ヒトまたは他の動物などの哺乳動物であり、典型的にはヒトである。いくつかの態様において、細胞、細胞集団、または組成物が投与される対象、例えば患者は、哺乳動物、典型的にはヒトなどの霊長類である。いくつかの態様において、霊長類はサルまたは類人猿である。対象は男性または女性であってよく、10
幼児、若年、青年、成人、および老年対象を含む任意の適切な年齢であってよい。いくつかの態様において、対象は、齧歯類などの非霊長類哺乳動物である。

【0542】

本明細書で用いられる場合、「処置」（および「処置する」または「処置すること」などの、その文法上の変形）は、疾患もしくは状態もしくは障害、またはそれに伴う症状、有害作用、もしくは転帰、もしくは表現型の完全なまたは部分的な改善または軽減を指す。処置の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減縮、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。20
本用語は、疾患の完全な治癒、または任意の症状の完全な除去、またはすべての症状もしくは転帰に対する効果を意味するものではない。

【0543】

本明細書で用いられる場合、「疾患の発症を遅延させること」とは、疾患（がんなど）の発症を延期し、妨げ、減速させ、遅らせ、安定化し、抑制し、かつ／または先延ばしにすることを意味する。この遅延は、処置される疾患および／または個体の病歴に応じて、様々な時間の長さであり得る。当業者には明白であるように、十分なまたは著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、事実上、予防を包含し得る。例えば、転移の発症などの末期がんが遅延され得る。

【0544】

本明細書で用いられる「予防すること」は、ある疾患に対する素因を有し得るがまだその疾患とは診断されていない対象において、該疾患の発生または再発に対する予防を提供することを含む。いくつかの態様において、提供される細胞および組成物は、疾患の発症を遅延させるためまたは疾患の進行を減速させるために使用される。30

【0545】

本明細書で用いられる場合、機能または活性を「抑制する」とことは、関心対象の条件またはパラメータを除くその他の点で同じ条件と比較して、あるいは別の条件と比較して、その機能または活性を低下させることである。例えば、腫瘍成長を抑制する細胞は、その細胞が存在しない場合の腫瘍の成長速度と比較して、腫瘍の成長速度を低下させる。

【0546】

投与との関連における、作用物質、例えば、薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」とは、必要な投薬量／量および期間において、治療結果または予防結果などの所望の結果を達成するのに有効な量を指す。40

【0547】

作用物質、例えば、薬学的製剤または細胞の「治療有効量」とは、必要な投薬量および期間において、疾患、状態、もしくは障害の処置などに関する所望の治療結果、および／または処置の薬物動態学的もしくは薬力学的な効果を達成するのに有効な量を指す。治療有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに投与される細胞集団などの因子に従って変動し得る。いくつかの態様において、提供される方法は、細胞および／または組成物を有効量で、例えば治療有効量で投与することを伴う。

【0548】

「予防有効量」とは、必要な投薬量および期間において、所望の予防結果を達成するのに有効な量を指す。予防用量は疾患の前または初期段階に対象において使用されるため、典型的には予防有効量は治療有効量よりも少ないが、必ずしもそうとは限らない。

【0549】

処置される疾患または状態は、抗原の発現が、疾患状態または障害の病因に関連しており、かつ／または関与している、例えばそのような疾患、状態、または障害を引き起こす、悪化させる、またはその他の点でそれらに関与している任意のものであってよい。例示的な疾患および状態には、悪性腫瘍もしくは細胞の形質転換を伴う疾患もしくは状態（例えば、がん）、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または例えば細菌、ウイルス、もしくは他の病原体によって引き起こされる感染症が含まれ得る。処置され得る様々な疾患および状態に関連している抗原を含む例示的な抗原は、上記されている。特定の態様において、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックTCRは、疾患または状態と関連している抗原に特異的に結合する。

10

【0550】

したがって、提供される方法および使用には、養子細胞療法のための方法および使用が含まれる。いくつかの態様において、本方法は、対象、組織、または細胞、例えば疾患、状態、もしくは障害を有するか、それらのリスクがあるか、またはそれらを有すると疑われるものなどへの、細胞または細胞を含有する組成物の投与を含む。いくつかの態様では、細胞、集団、および組成物が、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法によって、処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象に投与される。いくつかの態様では、細胞または組成物が、疾患もしくは状態を有するかまたはそれらのリスクがある対象などの対象に投与され、疾患または状態の1つまたは複数の症状を改善する。

20

【0551】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受ける予定の対象から、またはそのような対象に由来する試料から細胞が単離され、かつ／またはその他の方法で調製される自家移植によって行われる。したがって、いくつかの局面において、細胞は、処置および細胞を必要とする対象、例えば患者に由来し、単離および処理後に同じ対象に投与される。

【0552】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞療法を受ける予定であるかまたは最終的に細胞療法を受ける対象以外の対象、例えば第1対象から細胞が単離され、かつ／またはその他の方法で調製される同種移植によって行われる。そのような態様において、この細胞は次いで、同じ種の異なる対象、例えば第2対象に投与される。いくつかの態様において、第1対象と第2対象は遺伝子的に同一である。いくつかの態様において、第1対象と第2対象は遺伝的に類似している。いくつかの態様において、第2対象は第1対象と同じHLAクラスまたはスーパータイプを発現する。細胞は、任意の適切な手段によって投与され得る。投薬および投与は、投与が短期的であるか長期的であるかに一部依存し得る。様々な投薬計画には、単回または様々な時点にわたる複数回投与、ボース投与、およびパルス注入が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0553】

ある特定の態様において、細胞または細胞のサブタイプの個々の集団は、約100万～約1000億個の範囲の細胞および／または体重1キログラムにつきその量の細胞、例えば100万～約500億個の細胞など（例えば、約500万個の細胞、約2500万個の細胞、約5億個の細胞、約10億個の細胞、約50億個の細胞、約200億個の細胞、約300億個の細胞、約400億個の細胞、または前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）、例えば約1000万～約1000億個の細胞（例えば、約2000万個の細胞、約3000万個の細胞、約4000万個の細胞、約6000万個の細胞、約7000万個の細胞、約8000万個の細胞、約9000万個の細胞、約100億個の細胞、約250億個の細胞、約500億個の細胞、約750億個の細胞、約900億個の細胞、または前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）、および場合によっては約1億個の細胞～約500億個の細胞（例えば、約1億2000万個の細胞、約2億5000万個の細胞

40

50

、約3億5000万個の細胞、約4億5000万個の細胞、約6億5000万個の細胞、約8億個の細胞、約9億個の細胞、約30億個の細胞、約300億個の細胞、約450億個の細胞)、またはこれらの範囲の間にある任意の値が、かつ／または体重1キログラムにつき、対象に投与される。この場合も同様に、投薬量は、疾患もしくは障害および／または患者および／または他の処置に特有の特質に応じて変動し得る。いくつかの態様において、細胞は、併用処置の一部として、例えば、別の治療的介入、例えば抗体または操作された細胞または受容体または作用物質など、例えば細胞毒性剤または治療剤などと同時に、または任意の順序で逐次的に投与される。細胞はいくつかの態様において、1種または複数種の付加的な治療剤と、または別の治療的介入と関連して、同時にまたは任意の順序で逐次的に共投与される。状況によっては、細胞は、細胞集団が1種もしくは複数種の付加的な治療剤の効果を増強するように、またはその逆になるように、十分に近い時間内に別の治療法と共投与される。いくつかの態様において、細胞は、1種または複数種の付加的な治療剤の前に投与される。いくつかの態様において、細胞は、1種または複数種の付加的な治療剤の後に投与される。いくつかの態様において、1種または複数種の付加的な作用物質には、例えば持続性を増強するための、IL-2などのサイトカインが含まれる。いくつかの態様において、本方法は、化学療法剤の投与を含む。

10

【0554】

細胞の投与後、操作された細胞集団の生物学的活性はいくつかの態様において、例えばいくつかの公知の方法のいずれかによって測定される。評価するパラメータには、例えばイメージングによるインビボでの、または例えばELISAもしくはフローサイトメトリーによるエクスピボでの、抗原に対する操作されたT細胞もしくは天然T細胞または他の免疫細胞の特異的結合が含まれる。ある特定の態様において、標的細胞を破壊する操作された細胞の能力は、例えばKochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009) およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004) に記載されている細胞傷害性アッセイなどの、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて測定され得る。ある特定の態様において、細胞の生物学的活性は、CD107a、IFN γ 、IL-2、およびTNFなどの1種または複数種のサイトカインの発現および／または分泌をアッセイすることによって測定される。いくつかの局面において、生物学的活性は、腫瘍量または腫瘍負荷量の減少などの臨床転帰を評価することによって測定される。

20

【0555】

ある特定の態様において、操作された細胞は、それらの治療有効性または予防有効性が増加するように、いくつかの方法でさらに改変される。例えば、集団によって発現される操作されたCARまたはTCRは、ターゲティング部分に直接的に、またはリンカーを介して間接的にコンジュゲートされ得る。化合物、例えばCARまたはTCRをターゲティング部分にコンジュゲートする実践は、当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

30

【0556】

VI. 定義

特に定義されない限り、本明細書で用いられる専門用語、表記、ならびに他の技術用語および科学用語または用語法はすべて、特許請求される主題が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解されている意味を有する用語を、明確にするためにおよび／またはすぐに参照できるように本明細書において定義するが、本明細書にそのような定義を含めることは、当技術分野において一般に理解されているものとの実質的な相違を表すと必ずしも解釈されるべきではない。

40

【0557】

本明細書で用いられる場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その」は、特に文脈によって明白に指示されていない限り、その対象物の複数形も含む。例えば、「1つの (a)」または「1つの (an)」は、「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味する。本明細書に記載される局面および変形は、局面および変形「からなる」

50

ならびに／または局面および変形「から本質的になる」を含むと理解される。

【0558】

本開示を通して、特許請求される主題の様々な局面は、範囲形式で提示される。範囲形式での記載は、単に便宜上および簡潔化のためであり、特許請求される主題の範囲に対する確固たる限定として解釈されるべきでないことが、理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値をすべて具体的に開示していると見なされるべきである。例えば、ある値域が提供される場合、その範囲の上限値と下限値の間の各介在値、およびその規定範囲内の任意の他の規定値または介在値が、特許請求される主題内に包含されることが理解される。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は、独立的にそのより小さな範囲内に含まれてよく、これらもまた、規定範囲における任意の具体的に除外される限界値に従って、特許請求される主題内に包含される。規定範囲が限界値の一方または両方を含む場合、それら含まれた限界値の一方または両方を除外する範囲もまた、特許請求される主題内に含まれる。このことは、範囲の幅とは無関係に適用される。

10

【0559】

本明細書で用いられる「約」という用語は、当業者にとっては明白な、各値に関する通常の誤差範囲を指す。本明細書において「約」の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そのものに向けられた態様を含む（および記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は「X」の記載を含む。

【0560】

本明細書で用いられる場合、組成物とは、2種またはそれ以上の、細胞を含めた製品、物質、または化合物の任意の混合物を指す。組成物は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。

20

【0561】

本明細書で用いられる「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。本用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、およびそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。ベクターには、ウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクターといったレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターなどが含まれる。

30

【0562】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫も含む。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これには初代形質転換細胞、および継代数に関係なくそれらに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸の内容が親細胞と完全に一致していなくてもよく、変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書に含まれる。

【0563】

本明細書で用いられる場合、1つまたは複数の特定の細胞型または細胞集団に言及する場合の「濃縮すること」とは、集団もしくは細胞によって発現されるマーカーに基づく陽性選択、または枯渇されるべき細胞集団もしくは細胞上に存在しないマーカーに基づく陰性選択などによって、例えば組成物中の全細胞数もしくは組成物の体積と比較して、または他の細胞型に対して、細胞型または集団の数またはパーセンテージを増加させることを指す。本用語は、組成物からの他の細胞、細胞型、または集団の完全な除去を必要とせず、かつそのように濃縮された細胞が、濃縮組成物中に100%または100%近くさえ存在することを必要としない。

40

【0564】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカーに関して「陽性」で

50

あるという記述は、特定マーカー、典型的には表面マーカーが、細胞上または細胞中に検出可能な程度に存在することを指す。表面マーカーに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリーによって、例えばマーカーに特異的に結合する抗体で染色し該抗体を検出することによって、検出される表面発現の存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および／またはそのマーカーに関して陽性であることが公知である細胞のレベルと実質的に類似するレベルで、および／またはそのマーカーに関して陰性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に高いレベルで、フローサイトメトリーによって検出可能である。

【0565】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカーに関して「陰性」であるという記述は、特定マーカー、典型的には表面マーカーが、細胞上または細胞中に実質的に検出可能な程度に存在しないことを指す。表面マーカーに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリーによって、例えばマーカーに特異的に結合する抗体で染色し該抗体を検出することによって、検出される表面発現の非存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および／またはそのマーカーに関して陽性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に低いレベルで、および／またはそのマーカーに関して陰性であることが公知である細胞のレベルと比較して実質的に類似するレベルで、フローサイトメトリーによって検出されない。

【0566】

本明細書で用いられる「発現」という用語は、ポリペプチドが、遺伝子などの核酸分子のコード配列に基づいて産生される過程を指す。この過程には、転写、転写後制御、転写後修飾、翻訳、翻訳後制御、翻訳後修飾、またはそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【0567】

本明細書で用いられる場合、対照とは、それが試験パラメータで処理されない点以外は、試験試料と実質的に同一である試料を指し、またはそれが血漿試料である場合、対照は、関心対象の状態に罹患していない正常ボランティアから採取され得る。対照は内部対照であってもよい。

【0568】

VII. 例示的な態様

提供される態様は、以下である。

1. 以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) (i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 該組成物中のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質の存在下で、T細胞を含む組成物をインキュベートする工程；および

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

2. 受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって、組成物中の1つまたは複数のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様1に記載の方法。

3. 前記破壊が、前記インキュベーションの開始後30分を超えてからもたらされる、態様1または態様2に記載の方法。

4. 前記破壊が、前記インキュベーションの開始後1時間～4日、前記インキュベーションの開始後6時間～3日、前記インキュベーションの開始後12時間～2日、もしくは前記インキュベーションの開始後1日～3日にもたらされる；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間～約4日、前記インキュベーションの開始後約6時間～約3日、前記インキュベーションの開始後約12時間～約2日、もしくは

10

20

30

40

50

は前記インキュベーションの開始後約1日～約3日にもたらされる；または

前記破壊が、前記インキュベーションの開始後約1時間もしくはそれを超えてから、前記インキュベーションの開始後1日、2日、3日、もしくは4日以内に、もたらされる、態様1～3のいずれか1つに記載の方法。

5. 受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または

受容体結合物質が、TCR/CD3複体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または

受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、

態様1～4のいずれか1つに記載の方法。

6. 分子が、TCR/CD3複体の構成成分であるか、またはCD3である、態様1～5のいずれか1つに記載の方法。 10

7. 分子が第1の分子であり、受容体結合物質がさらに、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができ、該第2の分子が、任意で、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを誘導するかもしくは増強するか、減衰させるか、または改変することができる、態様1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. 受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様1～7のいずれか1つに記載の方法。

9. 前記破壊が、受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、態様1～8のいずれか1つに記載の方法。 20

10. 受容体結合物質が第1の受容体結合物質であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第2の分子が、任意で、T細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変することができる、態様1～9のいずれか1つに記載の方法。

11. 試薬が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、それによって、第2の受容体結合物質が該試薬に可逆的に結合されている、態様10に記載の方法。

12. 第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位、および第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位が、同じであるかまたは異なることができる、態様11に記載の方法。 30

13. 第2の受容体結合物質が、2つ以上の結合部位Z1に可逆的に結合することができる結合パートナーC1またはC2を含み、それによって、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が、2つ以上の結合部位Z1を介して試薬に可逆的に結合されており；かつ／または

第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、該試薬が、結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる複数の結合部位Z2をさらに含む、

態様11または態様12に記載の方法。

14. C2およびC1が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含有し；かつ／または 40

Z1およびZ2が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含有する、

態様13に記載の方法。

15. 試薬が第1の試薬であり、少なくとも、第2の受容体結合物質に可逆的に結合されている第2の試薬の存在下で、インキュベーションが実行される、態様1～14のいずれか1つに記載の方法。

16. 第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによってT細胞において第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様10～15の 50

いずれか1つに記載の方法。

17. 前記破壊が、第1の受容体結合物質と試薬との間、および／または第2の受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、態様7～16のいずれか1つに記載の方法。

18. 前記破壊が、第1の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させ、かつ、第2の受容体結合物質によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる、態様7～17のいずれか1つに記載の方法。

19. 以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

(a) T細胞を含む組成物を、

(i) T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式で、T細胞の表面上に発現している第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質；および

(ii) (i) 第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するようにT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる、第2の受容体結合物質

の存在下でインキュベートする工程；ならびに

(b) 該インキュベーションの開始後5日以内に、第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊し、それによって培養T細胞が生成される工程。

20. 第1の受容体結合物質が第1の分子に特異的に結合しかつ／または第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによってT細胞において1つまたは複数のシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様19に記載の方法。

21. 第2の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様19または態様20に記載の方法。

22. 第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる；または

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、態様7～21のいずれか1つに記載の方法。

23. 第2の分子が、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、態様7～22のいずれか1つに記載の方法。

24. 第2の分子がCD28である、態様7～23のいずれか1つに記載の方法。

25. 前記破壊が、第2の受容体結合物質と、第2の試薬であることができる試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の細胞への導入を含む、態様7～24のいずれか1つに記載の方法。

26. 前記破壊が、第2の受容体結合物質によって誘導もしくはモジュレートされたシグナルを終結もしくは減少させる；または

追加の分子がCD28であり、破壊が、T細胞においてCD28共刺激シグナルを終結もしくは減少させる、

態様7～25のいずれか1つに記載の方法。

27. 前記破壊の後、T細胞を含む組成物をさらにインキュベートする工程を含む、態様1～26のいずれか1つに記載の方法。

28. インキュベーションおよびさらなるインキュベーションが、同じ容器において実行さ

10

20

30

40

50

れ；かつ／または

さらなるインキュベーションが、物質の存在下で実行され；かつ／または

前記方法が、物質、受容体結合物質、第2の受容体結合物質、および／もしくは試薬を、さらなるインキュベーションの前に細胞組成物から除去する工程を含まない、態様27に記載の方法。

29. インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ でもしくは約 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で実行され；かつ／または

インキュベーションおよび／もしくはさらなるインキュベーションが、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、態様1～28のいずれか1つに記載の方法。

10

30. さらなる作用物質が、T細胞、CD4+ T細胞、および／またはCD8+ T細胞の増殖を増強または誘導することができる、態様29に記載の方法。

31. さらなる作用物質が、IL-2、IL-15、およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、態様30に記載の方法。

32. さらなるインキュベーションが、14日を超えない、12日を超えない、10日を超えない、8日を超えない、または6日を超えない期間にわたって実行される、態様27～32のいずれか1つに記載の方法。

33. 以下の工程を含む、T細胞を培養するための方法：

T細胞を含む組成物を、細胞においてCD28を介したシグナル伝達をもたらす条件下で、T細胞の表面上のCD28分子に特異的に結合する受容体結合物質の存在下でインキュベートする工程；および

20

該インキュベーションの開始後5日以内に、受容体結合物質とCD28分子との結合を排除するかまたは低減させ、これにより、CD28シグナル伝達が細胞において終結または減少し、それによって培養T細胞が生成される工程。

34. 排除または低減が、インキュベーションの開始後4日以内、3日以内、2日以内、または1日以内にもたらされる、態様33に記載の方法。

35. 排除または低減が、

それによって、CD28に特異的に結合されていない任意の受容体結合物質が組成物から除去されるかもしくは低減する、細胞の洗浄；または

受容体結合物質を組成物から除去するためもしくは低減させるための細胞の洗浄を任意でさらに含む、受容体結合物質とCD28分子との間の結合相互作用の逆転を含む、態様33または態様34に記載の方法。

30

36. インキュベーションの少なくとも一部の間、および／またはインキュベーションの後に、組成物中のT細胞を、TCR/CD3複合体の分子に特異的に結合する作用物質の存在下でインキュベートし、それによって、TCR/CD3複合体関連シグナルが細胞において誘導またはモジュレートされる、態様33～35のいずれか1つに記載の方法。

37. T細胞を含む組成物を、(i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii) T細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でCD28またはCD3以外のT細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質の存在下で、インキュベートし、それによって培養T細胞が生成される工程を含む、T細胞を培養するための方法。

40

38. 受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによってT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様37に記載の方法。

39. シグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルではない、態様37または態様38に記載の方法。

40. 受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様37～39のいずれか1つに記載の方法。

41. 受容体結合物質が第2の受容体結合物質であり、分子が第2の分子であり、1つまたは

50

複数のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第1の分子が、任意で、組成物中の1つまたは複数のT細胞において第1のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様37~40のいずれか1つに記載の方法。

42. 第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質に対する複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている；または

第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合されている、
態様41に記載の方法。

43. 第1の受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または

第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または
第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、
態様41または態様42に記載の方法。

44. 第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、もしくは改変することができる；または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる、
態様41~43のいずれか1つに記載の方法。

45. T細胞を含む組成物を、

(i) (i) 第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 該組成物中のT細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質；および

(ii) (i) 第2の受容体結合物質に対する複数の結合部位をさらに含む試薬に、または第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 該組成物中のT細胞において第2のシグナルを誘導またはモジュレートする様式でT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができ、該第2の分子がCD28以外である、第2の受容体結合物質

の存在下でインキュベートする工程であって、組成物中のT細胞においてシグナルおよび／または第2のシグナルが誘導またはモジュレートされる条件下で該インキュベーションが行われ、それによって培養T細胞が生成される工程を含む、T細胞を培養するための方法。

46. 第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し、かつ／または、第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、態様44に記載の方法。

47. 第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルを誘導もしくはモジュレートすることができ；かつ／または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、もしくは改変することができる；または

第2の分子に対する第2の受容体結合物質の特異的結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる、
態様45または態様46に記載の方法。

48. 第2の分子であることができる分子が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または

第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、
態様37~47のいずれか1つに記載の方法。

49. 第2の分子であることができる分子が、CD137ではなく、かつ／または、第2の受容体

10

20

30

40

50

結合物質であることができる受容体結合物質が、CD137に特異的に結合しない、態様37～48のいずれか1つに記載の方法。

50. 第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が、試薬に可逆的に結合し；かつ

(i) 第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が、各々個々に、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含むか；または

(ii) 第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含むか；または

(iii) 第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1、および各々が結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む

のいずれかである、

態様42～49のいずれか1つに記載の方法。

51. 標的細胞を含む組成物を、(i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii) 該組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式で標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質の存在下で、インキュベートし、該ストレプトアビジンムテインが、正味の負電荷を含むか、またはSEQ ID NO: 4もしくはSEQ ID NO: 6に示されるストレプトアビジンムテインの等電点未満の等電点を呈し、それによって培養標的細胞が生成される工程を含む、標的細胞を培養するための方法。

52. 標的細胞を含む組成物を、(i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii) 該組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式で標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質の存在下で、インキュベートし、該ストレプトアビジン類似体またはムテインが、アミノ酸の配列

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8)

を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対して、SEQ ID NO: 1～6のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンまたはムテインよりも高い親和性を呈し、それによって培養標的細胞が生成される工程を含む、標的細胞を培養するための方法。

53. 受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって組成物中の1つまたは複数の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様51または態様52に記載の方法。

54. 複数の結合部位が、2つ以上の結合部位Z1を含み；かつ

受容体結合物質が、結合部位Z1に可逆的に結合することができる結合パートナーC1を含み、C1とZ1との間の可逆的結合が、受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合をもたらす、

態様51～53のいずれか1つに記載の方法。

55. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、複数の結合部位Z1を含み、複数の受容体結合物質が、試薬に可逆的に結合されている、態様54に記載の方法。

56. 標的細胞が血液細胞を含み；

標的細胞が白血球を含み；

標的細胞がリンパ球を含み；

標的細胞がB細胞を含み；

- 標的細胞がB細胞集団を含み；
 標的細胞がT細胞を含み；
 標的細胞がT細胞集団を含み；かつ／または
 標的細胞がナチュラルキラー（NK）細胞を含む、
 態様51～56のいずれか1つに記載の方法。
57. 標的細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、調節性T細胞もしくはその集団、NK細胞もしくはその集団、抗原特異的B細胞もしくはその集団、メモリーB細胞もしくはその集団、または、調節性B細胞もしくはその集団を含む、態様51～56のいずれか1つに記載の方法。 10
58. 標的細胞がT細胞である、態様51～57のいずれか1つに記載の方法。
59. 分子が、T細胞の表面上に存在し、受容体結合物質が、組成物中のT細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様51～58のいずれか1つに記載の方法。
60. 受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または
 受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または
 受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、
 態様51～59のいずれか1つに記載の方法。
61. 分子が第1の分子であり、受容体結合物質が、1つまたは複数の標的細胞の表面上の第1の分子および第2の分子に特異的に結合することができ、該第2の分子に対する結合が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変することができる、態様51～60のいずれか1つに記載の方法。 20
62. 受容体結合物質が第1の受容体結合物質であり、1つまたは複数の標的細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第2の分子に対する結合が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するようにシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様51～61のいずれか1つに記載の方法。
63. 第2の受容体結合物質が第2の分子に特異的に結合しそれによって第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するように組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする条件下で、インキュベーションが行われる、態様62に記載の方法。 30
64. ストレプトアビジンムテインまたは類似体が、第2の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含み、それによって、第2の受容体結合物質がストレプトアビジンムテインまたは類似体に可逆的に結合されている、態様62または態様63に記載の方法。
65. 第2の受容体結合物質が、ストレプトアビジン類似体またはムテインに存在する2つ以上の結合部位Z2に可逆的に結合することができる結合パートナーC1またはC2を含む、態様64に記載の方法。
66. 追加の分子が、CD28、CD90（Thy-1）、CD95（Apo-/Fas）、CD137（4-1BB）、CD154（CD40L）、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択され；かつ／または
 第2の受容体結合物質が、CD28、CD90（Thy-1）、CD95（Apo-/Fas）、CD137（4-1BB）、CD154（CD40L）、ICOS、LAT、CD27、OX40、もしくはHVEMに特異的に結合する、
 態様61～65のいずれか1つに記載の方法。 40
67. 追加の分子が、CD40およびCD137の中から選択され；かつ／または
 第2の受容体結合物質が、CD40もしくはCD137に特異的に結合する、
 態様61～66のいずれか1つに記載の方法。
68. 第2の受容体結合物質が、複数の異なる受容体結合物質を含み、その各々が個々に、組成物中のT細胞の表面上の同じまたは異なる第2の分子に結合して、細胞において1つまたは複数のシグナルを集合的に誘導またはモジュレートすることができる、態様11～67の 50

いずれか1つに記載の方法。

69. 第1および／または第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊する工程をさらに含む、態様37～68のいずれか1つに記載の方法。

70. 破壊が、インキュベーションの開始後14日以内、インキュベーションの開始後12日以内、インキュベーションの開始後10日以内、インキュベーションの開始後8日以内、またはインキュベーションの開始後6日以内にもたらされる、態様69に記載の方法。

71. インキュベーションの少なくとも一部が、T細胞にシグナルを送達することができるさらなる作用物質の存在下で実行される、態様37～70のいずれか1つに記載の方法。

72. さらなる作用物質が、T細胞、CD4⁺ T細胞、および／またはCD8⁺ T細胞の増殖を増強または誘導することができる、態様71に記載の方法。

10

73. さらなる作用物質が、IL-2、IL-15、およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、態様71または態様72に記載の方法。

74. さらなる作用物質が、CD28に特異的に結合せず、かつ／またはCD28シグナル伝達を誘導しない、態様71～73のいずれか1つに記載の方法。

75. T細胞または標的細胞が、対象由来の初代細胞である、態様1～74のいずれか1つに記載の方法。

76. T細胞または標的細胞が、対象から直接単離される、態様1～75のいずれか1つに記載の方法。

77. T細胞が、分画されていないT細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD3⁺ T細胞である、濃縮されたかもしくは単離されたCD4⁺ T細胞である、または、濃縮されたかもしくは単離されたCD8⁺ T細胞である、態様1～50および57～76のいずれか1つに記載の方法。

20

78. インキュベートする工程の前に、T細胞が、CD62L⁺細胞について濃縮されておらず、かつ／またはナイーブT細胞について濃縮されていない、態様1～50および57～77のいずれか1つに記載の方法。

79. T細胞または標的細胞が、ヒト細胞である、態様1～78のいずれか1つに記載の方法。

80. 試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、態様1～80のいずれか1つに記載の方法。

30

81. 試薬が、前記インキュベーションの間、支持体または固体支持体に結合されていない、態様1～80のいずれか1つに記載の方法。

82. 試薬が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体に結合されており、それによって、複数のT細胞または標的細胞が、インキュベーションの少なくとも一部の間、支持体上に可逆的に固定化されている、態様1～80のいずれか1つに記載の方法。

83. 支持体が、固体支持体または固定相である、態様82に記載の方法。

84. 第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、前記結合部位B2のうちの1つのみを含み；かつ／または

第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、一価様式で分子に特異的に結合する、態様1～83のいずれか1つに記載の方法。

40

85. 第2の受容体結合物質が、前記結合部位B4のうちの1つのみを含み；かつ／または

第2の受容体結合物質が、一価様式で分子に特異的に結合する、態様1～84のいずれか1つに記載の方法。

86. 結合部位B2および／またはB4が、抗体結合部位を含む、態様84または態様85に記載の方法。

87. 第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、各々個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、およびMHC分子、ならびにそれらの結合断片の中から選択される、態様1～86のいずれか1つ

50

に記載の方法。

88. 第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、抗体断片を含み；

第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、Fab断片を含み；

第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv)断片の中から選択される二価抗体断片であり；

第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片であり；かつ／または

第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グロボディ、アンキリンスキヤホールドをベースにしたタンパク質、結晶スキヤホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、およびアビマーの中から選択される、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子である、
態様1～87のいずれか1つに記載の方法。

89. 第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、任意で、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体断片、抗CD3抗体の一価抗体断片、および抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択される、CD3に特異的に結合する作用物質を含み、かつ／または

第2の受容体結合物質が、任意で、抗CD28抗体、抗CD28抗体の二価抗体断片、抗CD28抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD28結合分子、抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体断片、抗CD90抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD90結合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体断片、抗CD95抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD95結合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体の二価抗体断片、抗CD154抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD154結合分子、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体断片、抗CD137抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD137結合分子、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の二価抗体断片、抗ICOS抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性ICOS結合分子、抗LAT抗体、抗LAT抗体の二価抗体断片、抗LAT抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性LAT結合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体の二価抗体断片、抗CD27抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD27結合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体の二価抗体断片、抗OX40抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性OX40結合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の二価抗体断片、抗HVEM抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性HVEM結合分子、および4-1BBリガンド、ならびにこれらの任意の混合物からなる群より選択される、CD28、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40、および／またはHVEMに特異的に結合する作用物質を含む、
態様1～88のいずれか1つに記載の方法。

90. 試薬が、ビオチン、ビオチン類似体、もしくはそれらの生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するアビジンもしくはストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン、遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；または、ビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質であ

10

20

30

40

50

るか、あるいはそれを含む、態様1～50および68～89のいずれか1つに記載の方法。

91. 試薬が、ビオチンまたは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；

試薬が、ビオチン類似体または生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；かつ／または

試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む、

態様1～94のいずれか1つに記載の方法。

92. 試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド（CBP）に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質（MBP）に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質の、オリゴマーまたはポリマーである、態様1～91のいずれか1つに記載の方法。

93. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、態様1～92のいずれか1つに記載の方法。

94. オリゴマーまたはポリマーの個々の分子が、多糖または二官能性リンカーによって架橋されている、態様92または態様93に記載の方法。

95. 複数の結合部位が、少なくとも2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、72個、またはそれよりも多い結合部位を含む、態様1～94のいずれか1つに記載の方法。

96. ストレプトアビジン結合ペプチドが、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、態様90～95のいずれか1つに記載の方法。

97. 試薬が、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むストレプトアビジン類似体もしくはムテインを含む；または

ストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、
態様1～96のいずれか1つに記載の方法。

98. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a) SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

(b) SEQ ID NO: 3～6、27、および28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c) ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、(a) または(b) の機能的断片

を含む、態様1～51および68～97のいずれか1つに記載の方法。

10

99. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として117、120、および／または121に対応する位置に、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様97または態様98に記載の方法。

100. 1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121、もしくはPhe121の中から選択される；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121の1つもしくは複数から選択される；または

アミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121から選択される、態様99に記載の方法。

20

101. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a) SEQ ID NO: 27または28に示されるアミノ酸の配列；

(b) SEQ ID NO: 28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰、およびTyr¹²¹に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c) ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、(a) または(b) の機能的断片

30

を含む、態様51～100のいずれか1つに記載の方法。

102. 結合パートナーC1および／または結合パートナーC2が、独立して、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-

Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

40

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを含む、態様1～101のいずれか1つに記載の方法。

103. 前記破壊が、第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質と、試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組成物の、細胞への導入を含む、態様1～36および69～102のいずれか1つに記載の方法。

104. 物質が、遊離の結合パートナーであり、かつ／または競合物質である、態様103に記載の方法。

105. 組成物中の物質が、T細胞または標的細胞に対して有害ではなく、かつ／または、該物質の添加が、生存するT細胞または標的細胞のパーセンテージを、該物質を伴わない同等の条件または同じ条件下でのそれぞれT細胞または標的細胞のインキュベーションと比

50

較した際に、90%、80%、70%、60%、または50%未満に低減させない、態様103または態様104に記載の方法。

106. 前記破壊が、T細胞または標的細胞において、受容体結合物質または第2の受容体結合物質の一方または両方によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減少させる、態様1~36および69~105のいずれか1つに記載の方法。

107. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテイン、またはそれらの生物学的に活性な断片であるか、またはそれを含み；かつ

物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、態様10~18、22~32、および69~107のいずれか1つに記載の方法。

10

108. 物質が、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-
(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-
Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-
Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-
Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドであり；かつ／または

20

物質が、C1もしくはその類似体であるか、またはC2もしくはその類似体である、態様107に記載の方法。

109. 前記結合部位Z1と前記結合パートナーC1との間の可逆的結合、および／または前記結合部位Z2と前記結合パートナーC2との間の可逆的結合の解離定数 (K_D) が、 10^{-2} M~ 10^{-13} Mの範囲である、態様1~108のいずれか1つに記載の方法。

110. インキュベーションの前に、細胞を、組成物のT細胞もしくは標的細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質と接触させ、それによって、T細胞もしくは標的細胞を含む組成物を生成もしくは取得する；または

インキュベーションの少なくとも一部が、さらに、組成物のT細胞もしくは標的細胞が含むマーカーに特異的に結合する選択物質の存在下で実行され、培養T細胞が、マーカーを含むT細胞もしくは標的細胞について濃縮される、態様1~109のいずれか1つに記載の方法。

30

111. 選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位をさらに含む試薬に、可逆的に結合されている；または

選択物質が、選択物質に特異的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に、可逆的に結合されている、態様110に記載の方法。

112. シグナルの誘導またはモジュレーションが、シグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、培養T細胞の増大（増殖）および／または活性化における増加をもたらす、態様1~110のいずれか1つに記載の方法。

40

113. 増加が、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍であるか、またはそれよりも大きい、態様112に記載の方法。

114. 追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションが、追加のまたは第2のシグナルの誘導またはモジュレーションの非存在下でのT細胞のインキュベーションと比較して、T細胞の増大（増殖）および／または活性化を増加させる、態様7~113のいずれか1つに記載の方法。

115. 増加が、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍であるか、またはそれを上回る、態様114に記載の方法。

116. インキュベーションの前、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下、また

50

は、インキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合し、かつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下の、組成物中のT細胞と各々比較して、組成物中のT細胞の増大および／もしくは増殖を増加させる、組成物中のT細胞の代謝プロファイルを変更する、組成物中のCD8+ T細胞のサブセットを変更し；かつ／または、組成物中の長命メモリーT細胞のパーセンテージを増加させる、態様1～115のいずれか1つに記載の方法。

117. CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、またはCD8+細胞の数またはパーセンテージが、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD3+ T細胞、CD4+ T細胞、またはCD8+ T細胞の数またはパーセンテージとそれぞれ比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞；

10

組成物中のCD8+ T細胞の比率、またはCD8+ T細胞の相対比率もしくは正規化比率が、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD8+ T細胞の比、または相対比率もしくは正規化比率と比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞；

組成物中のCD62L+、任意で長命メモリーT細胞、またはメモリー幹細胞 (T_{SCM}) の数またはパーセンテージが、インキュベーションの前の組成物中の、インキュベーションの後であるが破壊の非存在下での組成物中の、または、類似のインキュベーションの後であるが、CD28に特異的に結合しかつ／またはCD28シグナル伝達を誘導もしくはモジュレートする作用物質の存在下における組成物中のCD62L+、長命メモリーT細胞、または T_{SCM} のいずれかの対応する細胞の集団の数またはパーセンテージと比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍増加している、培養T細胞を結果としてもたらす、態様1～116のいずれか1つに記載の方法。

20

118. 培養T細胞が、組成物中の全T細胞に対するまたは組成物中の全細胞に対するパーセンテージとして35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、または90%を上回る、CD62Lについて表面が陽性 (CD62L+) である表現型を含むT細胞サブセットを含む、態様1～117のいずれか1つに記載の方法。

30

119. T細胞サブセットが、

(a) CD127+；ならびに／または

(b) CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちのいずれか1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2R β +、CXCR3+、およびLFA-1+のうちのいずれか1つまたは複数

を含む表現型をさらに含む、態様118に記載の方法。

120. T細胞サブセットが、

(a) 低レベルのTCR再構成切除サークル (TREC) を含み；かつ／または

(b) 任意でKi-67である増殖マーカーを発現されており；かつ／または

(c) 刺激物質の存在下で増殖する能力を呈し；かつ／または

(d) 刺激物質の存在下でIFN- γ 、TNF、およびIL-2の中から選択されるサイトカインを産生する能力を呈する、

40

態様118または態様119に記載の方法。

121. 刺激物質が、抗原、恒常性サイトカイン、任意でIL-15および／もしくはIL-17であるか、または、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができる作用物質である、態様120に記載の方法。

122. T細胞サブセットが、長命メモリーT細胞であるかまたはそれを含む、態様118～121のいずれか1つに記載の方法。

123. T細胞サブセットが、Tメモリー幹細胞 (T_{SCM}) であるかまたはそれを含む、態様118

50

～122のいずれか1つに記載の方法。

124. 集団のT細胞または標的細胞に組換え核酸分子を導入する工程をさらに含み、核酸分子が組換えタンパク質をコードし、それによって、細胞が組換えタンパク質を発現する、態様1～123のいずれか1つに記載の方法。

125. 組換え受容体が、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体（TCR）である、態様124に記載の方法。

126. インビトロまたはエキスピボで行われる、態様1～125のいずれか1つに記載の方法。

127. 培養細胞を、疾患または状態を有する対象に投与する工程をさらに含む、態様1～126のいずれか1つに記載の方法。

128. 態様1～127のいずれか1つに記載の方法によって産生された複数の培養T細胞または標的細胞、および任意で、薬学的に許容される賦形剤を含む、組成物。 10

129. 物質の添加後に、細胞が、30℃よりも高い温度で、24時間超、48時間超、72時間超、または96時間超にわたって、インビトロまたはエキスピボでインキュベートされていない、態様128に記載の組成物。

130. (a) 受容体結合物質に結合することができる複数の結合部位を含む、試薬；および (b) (i) 試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) T細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする様式でCD28またはCD3ではないT細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる、受容体結合物質を含む、製造物品。 20

131. 分子への結合が、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のT細胞におけるシグナルを誘導もしくはモジュレートし；かつ／または

分子への結合が、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化する、態様130に記載の製造物品。

132. 分子が、CD90（Thy-1）、CD95（Apo-/Fas）、CD137（4-1BB）、CD154（CD40L）、ICOS、LAT、CD27、OX40、およびHVEMの中から選択される、態様130または態様131に記載の製造物品。

133. 分子がCD137ではない、態様130～132のいずれか1つに記載の製造物品。

134. (a) 作用物質に結合することができる複数の結合部位を含むストレプトアビジン類似体またはムテインである試薬であって、該ストレプトアビジン類似体またはムテインが、正味の負電荷を含む、または、SEQ ID NO: 4もしくは6に示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンムテインよりも低い等電点を呈し、かつ／または、アミノ酸の配列 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（SEQ ID NO: 8）を含むストレプトアビジン結合ペプチドに対して、SEQ ID NO: 4もしくは6に示されるアミノ酸の配列を含むストレプトアビジンもしくはムテインよりも高い親和性を呈する、試薬；および 30

(b) (i) 該試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる、作用物質を含む、製造物品。

135. 受容体結合物質または作用物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質または作用物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様130～134のいずれか1つに記載の製造物品。 40

136. 受容体結合物質が第2の受容体結合物質であり、分子が第2の分子であり、かつ、試薬が、(c) 第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位、および(d) (i) 試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) T細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質をさらに含む、態様130～133のいずれか1つに記載の製造物品。

137. 作用物質または第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複体のメンバーに特異的に結合し、かつ／または、第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、態様134または態様136に記載の製造物品。

138. (i) 第1の受容体結合物質および第2の受容体結合物質が、各々個々に、結合パート 50

ナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む；または

(ii) 第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1および結合パートナーC2に結合して第1および第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む；または

(iii) 第1の受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、第2の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1、および各々が結合パートナーC2に結合して第2の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む、
態様136または態様137に記載の製造物品。

10

139. 試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、
態様130～139のいずれか1つに記載の製造物品。

140. 試薬が、支持体または固体支持体に結合されていない、態様130～139のいずれか1つに記載の製造物品。

141. 試薬が、支持体に結合されているかまたは固定化されている、態様130～140のいずれか1つに記載の製造物品。

20

142. 支持体が、固体支持体または固定相である、態様141に記載の製造物品。

143. 支持体が、ビーズ、粒子、ナノ粒子、またはマイクロスフェアを含む、態様141または態様142に記載の製造物品。

144. 作用物質、第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質が、各々個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、およびそれらの結合断片の中から選択される、態様130～143のいずれか1つに記載の製造物品。

145. 作用物質、第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第1の受容体結合物質が、抗体断片を含む；

30

作用物質、第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第1の受容体結合物質が、Fab断片を含む；

作用物質、第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第1の受容体結合物質が、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv)断片の中から選択される二価抗体断片である；または

作用物質、第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／または第1の受容体結合物質が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片である、

態様130～144のいずれか1つに記載の製造物品。

146. 作用物質または第1の受容体結合物質が、任意で、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体断片、抗CD3抗体の一価抗体断片、および抗体様結合特性を有するタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択される、CD3に特異的に結合する作用物質を含み、かつ／または

40

作用物質、または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、任意で、抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体断片、抗CD90抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD90結合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体断片、抗CD95抗体の抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD95結合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体の二価抗体断片、抗CD154抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD154結合分子、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体断片、抗CD137抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD137結合分子、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の二価抗体断片、抗ICOS抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性ICOS結合分

50

子、抗LAT抗体、抗LAT抗体の一価抗体断片、抗LAT抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性LAT結合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体の二価抗体断片、抗CD27抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性CD27結合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体の二価抗体断片、抗OX40抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性OX40結合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の二価抗体断片、抗HVEM抗体の一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性HVEM結合分子、およびこれらの任意の混合物からなる群より選択される、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40、またはHVEMに特異的に結合する作用物質を含む、
態様130～145のいずれか1つに記載の製造物品。

147. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；または

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、
態様130～147のいずれか1つに記載の製造物品。

148. 態様130～147のいずれか1つに記載の製造物品、および任意で使用説明書を含む、キット。

149. 受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質をさらに含む、
態様148に記載のキット。

150. (a) (i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬；および(ii) 該試薬に可逆的に結合されており、かつ標的細胞の表面上に発現している分子に特異的に結合することができる受容体結合物質であって、任意で、該分子に対する結合が、標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートする、受容体結合物質、を含む可逆的試薬；ならびに

(b) 受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む、キット。

151. 標的細胞がT細胞である、態様150に記載のキット。

151. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；または

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、
態様150または態様151に記載のキット。

152. 物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、態様149～151のいずれか1つに記載のキット。

153. 試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、
態様150～152のいずれか1つに記載のキット。

154. 試薬が、支持体または固体支持体に結合されていない、態様150～153のいずれか1つに記載のキット。

155. 標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物であって、

組成物中の全T細胞または組成物中の全細胞に対するパーセンテージとして、35%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を上回る細胞が、CD3+、CD4+またはCD8+、およびCD62L+、ならびに、CD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちの1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+、およびLFA-1+のうち

10

20

30

40

50

の1つまたは複数である表面表現型を含むT細胞サブセットを含み；かつ

(a) 遺伝子操作前にまたは遺伝子操作の間、該T細胞サブセットを含む複数のT細胞が；

(i) GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされなかった；

(ii) 組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15の存在下でインキュベートされなかった；もしくは

(iii) CD62L+細胞について濃縮されなかった；または

(b) 組成物が、GSK-P阻害剤、または組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15を含まない

のいずれかまたは両方である、組成物。

156. T細胞サブセットが、少なくとも 5×10^6 個、少なくとも 1×10^6 個、または少なくとも 2×10^6 個の細胞を含む、態様155に記載の組成物。

10

157. 標的抗原に特異的に結合する組換え受容体を発現するように遺伝子操作された複数のT細胞を含む組成物であって、

遺伝子操作されたT細胞が、CD3+、CD4+またはCD8+、およびCD62L+、ならびに、CD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+、およびCD27+のうちの1つまたは複数、ならびに、t-bet^{low}、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+、およびLFA-1+のうちの1つまたは複数である表面表現型を含むT細胞サブセットを含むT細胞の集団の形質導入に由来し、該T細胞サブセットが、該集団中の全T細胞に対し、

(a) 該表現型を含む1つもしくは複数のマーカーの表面発現に基づいてヒト対象から分離されたかもしくは濃縮された、初代T細胞を含む集団；または

20

(b) GSK-P阻害剤の存在下でインキュベートされたT細胞の集団；

(c) 組換え恒常性サイトカイン、任意でIL-7もしくはIL-15の存在下でインキュベートされたT細胞の集団；または

(d) 抗CD3および抗CD8によって刺激されたが、刺激もしくは活性化が、1日、2日、3日、4日、もしくは5日を上回る期間にわたり、かつ／または刺激がビオチンもしくはビオチン類似体の存在下で妨害されなかった、T細胞の集団

のいずれかと比較して、より大きなパーセンテージで存在するかまたはより多い数で存在する、組成物。

158. T細胞サブセットが、集団中の全T細胞に対するパーセンテージとして、35%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%を上回ってまたは約35%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%を上回って、該集団に存在する；または

30

T細胞サブセットが、少なくとも細胞 5×10^6 個、 1×10^6 個、 2×10^6 個、もしくはそれよりも多くを含む、

態様156に記載の組成物。

159. 薬学的組成物である、態様155～158のいずれか1つに記載の組成物。

160. 態様128、態様129、および態様154～158のいずれか1つに記載の組成物を、疾患または状態を有する対象に投与する工程を含む、処置の方法。

161. 細胞が、組換え受容体、キメラ抗原受容体、またはTCRを含み、かつ、組換え受容体、キメラ抗原受容体、またはトランスジェニックTCRが、疾患または状態と関連する抗原に特異的に結合する、態様160に記載の処置の方法。

40

162. 疾患または状態が、がん、および自己免疫性の疾患もしくは障害、または感染性疾患である、態様160または態様161に記載の処置の方法。

163. (i) 受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されており；かつ(ii) 標的細胞においてシグナルを誘導もしくはモデュレートしかつ／または標的細胞の機能を変更する様式でCD28、CD3、CD137、またはCD40以外の標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる受容体結合物質の存在下で、標的細胞を含む組成物をインキュベートし、それによって培養標的細胞が生成される工程を含む、標的細胞を培養するための方法。

164. 受容体結合物質が、サイトカイン受容体に特異的に結合する、ケモカイン受容体に特異的に結合する、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、

50

ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、態様163に記載の方法。

165. 受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、TNFR2、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、態様163または態様164に記載の方法。

166. 受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、TNFR2、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF、IL-7、IL-21、およびIL-9の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様163～165のいずれか1つに記載の方法。

167. 受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様163～165のいずれか1つに記載の方法。

168. 受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、態様163または態様164に記載の方法。

169. 受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様163、態様164、または態様168に記載の方法。

170. 受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様163、態様164、態様168、または態様169のいずれか1つに記載の方法。

171. 接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a（LFA-1）、CD29、CD54（ICAM-1）、CD62L（L-セレクトリン）、およびCD29/CD49d（VLA-4）、CD106（VCAM-1）の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、態様163または態様164に記載の方法。

172. 接着分子が、LFA-1、L-セレクトリン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、態様171に記載の方法。

173. 因子が核因子である、態様163または態様164に記載の方法。

174. 因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ （ROR γ ）またはROR α である、態様163、態様164、または態様173に記載の方法。

175. 標的細胞が血液細胞を含み；

標的細胞が白血球を含み；

標的細胞がリンパ球を含み；

標的細胞がB細胞を含み；

標的細胞がB細胞集団を含み；

標的細胞がT細胞を含み；

標的細胞がT細胞集団を含み；かつ／または

標的細胞がナチュラルキラー（NK）細胞を含む、

態様163～174のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

176. 標的細胞が免疫細胞を含む、態様163~175のいずれか1つに記載の方法。
177. 標的細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、調節性T細胞もしくはその集団、NK細胞もしくはその集団、抗原特異的B細胞もしくはその集団、メモリーB細胞もしくはその集団、または、調節性B細胞もしくはその集団を含む、態様163~176のいずれか1つに記載の方法。
178. 標的細胞がT細胞である、態様163~177のいずれか1つに記載の方法。
179. 標的細胞が、対象由来の初代細胞である、態様163~178のいずれか1つに記載の方法。
180. 受容体結合物質が分子に特異的に結合しそれによって標的細胞においてシグナルを誘導もしくはモジュレートし、かつ／または標的細胞における機能を変更する条件下で、インキュベーションが行われる、態様163~179のいずれか1つに記載の方法。 10
181. 受容体結合物質が、結合パートナーC1を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様163~180のいずれか1つに記載の方法。
182. 受容体結合物質が追加の受容体結合物質であり、分子が追加の分子であり、1つまたは複数のT細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる第1の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第1の分子が、任意で、組成物中の1つまたは複数のT細胞において第1のシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様163~181のいずれか1つに記載の方法。 20
183. 第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質および追加の受容体結合物質に対する複数の結合部位を含む試薬に可逆的に結合されている；または
第1の受容体結合物質が、第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位を含む第2の試薬に可逆的に結合されている、
態様182に記載の方法。
184. 第1の受容体結合物質が、T細胞においてTCR/CD3複合体関連シグナルを開始することができ；かつ／または
第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し；かつ／または
第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、
態様182または態様183に記載の方法。 30
185. 第1の受容体結合物質が、結合パートナーC2を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC2に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z2を含む、態様182~184のいずれか1つに記載の方法。
186. 1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第2の分子が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するように組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様182~185のいずれか1つに記載の方法。
187. 第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；
第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる；
または
第2の分子が、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、
態様186に記載の方法。 40
188. 第2の分子が、CD28およびCD137の中から選択される、態様186または態様187のいずれか1つに記載の方法。
189. 第2の分子がCD28である、態様186~188のいずれか1つに記載の方法。
190. 第2の受容体結合物質が、結合パートナーC3を含み、複数の結合部位が、各々が結合パートナーC3に結合して第1の受容体結合物質と試薬との間に可逆的結合を形成すること 50

ができる2つ以上の結合部位Z3を含む、態様186～188のいずれか1つに記載の方法。

191. C1およびC2、C1およびC3、C2およびC3、または、C1、C2、およびC3が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含む；

Z1およびZ2、Z1およびZ3、Z2およびZ3、または、Z1、Z2、およびZ3が、同じもしくは実質的に同じであるか、または、同じもしくは実質的に同じ部分を含む、態様163～190のいずれか1つに記載の方法。

192. 試薬が、インキュベーションの少なくとも一部にわたって、支持体上に固定化されているか、または固定化されることができ、それによって、（追加の、第1のおよび／または第2の）受容体結合物質が、支持体上に固定化されているか、または固定化されることができる、態様163～191のいずれか1つに記載の方法。

10

193. 支持体が、固定相であるかもしくはそれを含み；かつ／または

支持体が、固体支持体であるかもしくはそれを含む、態様192に記載の方法。

194. 試薬が、前記インキュベーションの間、固体支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁性粒子、および／もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合されていないかしくはそれらと会合しておらず；かつ／または

試薬が、柔軟性であり、金属もしくは磁性コアを含むせず、完全にもしくは主に有機多量体から構成されており、球形ではなく、実質的に球形もしくは均一な形状ではなく、かつ／もしくは硬直していない；

試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；または

20

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、態様163～191のいずれか1つに記載の方法。

195. 追加の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、結合部位B1を含み；かつ／または

追加の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、該結合部位B1のうちの1つのみを含み；かつ／または

追加の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、一価様式で分子に特異的に結合する、

態様163～194のいずれか1つに記載の方法。

30

196. 第1の受容体結合物質が、結合部位B2を含み；かつ／または

第1の受容体結合物質が、該結合部位B2のうちの1つのみを含み；かつ／または

第1の受容体結合物質が、一価様式で分子に特異的に結合する、態様163～195のいずれか1つに記載の方法。

197. 第2の受容体結合物質が、結合部位B4を含み；かつ／または

第2の受容体結合物質が、該結合部位B4のうちの1つのみを含み；かつ／または

第2の受容体結合物質が、一価様式で分子に特異的に結合する、態様163～196のいずれか1つに記載の方法。

198. 結合部位B2および／またはB4が、抗体結合部位を含む、態様195～197のいずれか1つに記載の方法。

40

199. 追加の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、サイトカイン、ケモカイン、または接着分子の中から選択される、態様163～198のいずれか1つに記載の方法。

200. （追加の、第1のおよび／または追加の）受容体結合物質が、各々個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含む分子、アプタマー、およびMHC分子、ならびにそれらの結合断片の中から選択される、態様163～199のいずれか1つに記載の方法。

201. （追加の、第1のおよび／または追加の）受容体結合物質が、抗体断片を含む；

（追加の、第1のおよび／または追加の）受容体結合物質が、Fab断片を含む；

（追加の、第1のおよび／または追加の）受容体結合物質が、F(ab')₂断片および二価一

50

本鎖Fv (scFv) 断片の中から選択される二価抗体断片である；

(追加の、第1のおよび／または追加の) 受容体結合物質が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片であり；かつ／または

(追加の、第1のおよび／または追加の) 受容体結合物質が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グロボディ、アンキリンスキャホールドをベースにしたタンパク質、結晶スキャホールドをベースにしたタンパク質、アドネクチン、およびアビマーの中から選択される、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子である、

態様163～200のいずれか1つに記載の方法。

202. 試薬が、ビオチン、ビオチン類似体、もしくはそれらの生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質であるか、またはそれを含む、態様163～201のいずれか1つに記載の方法。

203. 試薬が、ビオチンまたは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；

試薬が、ビオチン類似体または生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；かつ／または

試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、またはアビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む、

態様163～202のいずれか1つに記載の方法。

204. 試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片に可逆的に結合する、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン；ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、ストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体もしくはムテイン；遷移金属イオンに結合することができる少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬；オリゴヒスチジン親和性タグに結合することができる作用物質；グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合することができる作用物質；カルモジュリンもしくはその類似体；カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合することができる作用物質；FLAG-ペプチドに結合することができる作用物質；HAタグに結合することができる作用物質；マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合することができる作用物質；HSVエピトープに結合することができる作用物質；mycエピトープに結合することができる作用物質；またはビオチニル化担体タンパク質に結合することができる作用物質の、オリゴマーまたはポリマーである、態様163～203のいずれか1つに記載の方法。

205. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、態様163～204のいずれか1つに記載の方法。

206. オリゴマーまたはポリマーの個々の分子が、多糖または二官能性リンカーによって架橋されている、態様204または態様205に記載の方法。

207. 複数の結合部位が、少なくとも2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、72個、またはそれよりも多い結合部位を含む、態様163～206のいずれ

10

20

30

40

50

か1つに記載の方法。

208. ストレプトアビジン結合ペプチドが、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys
(SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-
Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-
Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、態様202～207のいずれか1つに記載の方法。

10

209. 試薬が、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配列中のストレプトアビジンにおける
位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷
もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むストレプトアビジン類似体もしくはムテインを
含む；または

ストレプトアビジン類似体もしくはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の配
列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として44～47位に対応する配列位置に、ア
ミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、
態様163～208のいずれか1つに記載の方法。

210. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a) SEQ ID NO: 3～6、27、または28のいずれかに示されるアミノ酸の配列；

20

(b) SEQ ID NO: 3～6、27、または28のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%
、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、
またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷に対応するアミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくはその生物学的に活
性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、ま
たはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c) ビオチンもしくはその生物学的に活性な形態、ビオチン類似体もしくはムテインも
しくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的
に結合する、(a) または(b) の機能的断片

を含む、態様163～209のいずれか1つに記載の方法。

30

211. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸の
配列中のストレプトアビジンにおける位置を基準として117、120、および/または121に
対応する位置に、1つまたは複数のアミノ酸置換をさらに含む、態様209または態様210に
記載の方法。

212. 1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121、もしくはPhe121の中から選択される；または

1つもしくは複数のアミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121の1つもしくは複
数から選択される；または

アミノ酸置換が、Glu117、Gly120、もしくはTyr121から選択される、
態様211に記載の方法。

40

213. ストレプトアビジン類似体またはムテインが、

(a) SEQ ID NO: 27または28に示されるアミノ酸の配列；

(b) SEQ ID NO: 28に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い配列同一性を呈し、Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰、およびTyr¹²¹に対応するア
ミノ酸配列を含有し、かつ、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体も
しくはムテインもしくはそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合
ペプチドに可逆的に結合する、アミノ酸の配列；または

(c) ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、ビオチン類似体もしくはムテインもしく
はそれらの生物学的に活性な断片、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結

50

合する、(a) または(b) の機能的断片

を含む、態様163~212のいずれか1つに記載の方法。

214. 結合パートナーC1および／または結合パートナーC2が、独立して、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17),

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ

ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを含む、

態様163~213のいずれか1つに記載の方法。

215. 第1および／または第2の受容体結合物質と試薬との間の可逆的結合を破壊する工程
をさらに含む、態様163~214のいずれか1つに記載の方法。

216. 前記破壊が、第1の受容体結合物質であることができる受容体結合物質、および／ま
たは第2の受容体結合物質と、試薬との間の結合を逆転させることができる物質を含む組
成物の細胞への導入を含む、態様215に記載の方法。

217. 物質が、遊離の結合パートナーであり、かつ／または競合物質である、態様216に記
載の方法。

218. 組成物中の物質が、T細胞または標的細胞に対して有害ではなく、かつ／または、該
物質の添加が、生存するT細胞または標的細胞のパーセンテージを、該物質を伴わない同
等の条件または同じ条件下でのT細胞または標的細胞のインキュベーションとそれぞれ比
較した際に、90%、80%、70%、60%、または50%未満に低減させない、態様216または
態様217に記載の方法。

20

219. 前記破壊が、T細胞または標的細胞において、受容体結合物質または第2の受容体結
合物質の一方または両方によって誘導またはモジュレートされたシグナルを終結または減
少させる、態様215~218のいずれか1つに記載の方法。

220. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体もしくはムテ
イン、または、および、アビジン類似体もしくはムテイン、またはそれらの生物学的に活
性な断片であるか、またはそれを含み；かつ

30

物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、
任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、
態様215~219のいずれか1つに記載の方法。

221. 物質が、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-

(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (SEQ ID NO: 19)

40

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドであり；かつ／または

物質が、C1、C2、もしくはC3、またはそれらの類似体である、

態様220に記載の方法。

222. シグナルの誘導またはモジュレーションが、シグナルの誘導またはモジュレーショ
ンの非存在下での組成物中の標的細胞、任意でT細胞と比較して、化学走性、接着、サイ
トカイン産生、増殖（増大）、細胞傷害活性、代謝活性の中から選択される、変更された
活性を結果としてもたらし；かつ／または

インキュベーションの前の組成物中の標的細胞、任意でT細胞の機能活性と比較して、
変更された機能活性が、化学走性、接着、サイトカイン産生、増殖（増大）、細胞傷害活

50

性、代謝活性の中から選択され；かつ／または

培養標的細胞が、インキュベーションの前の組成物中の標的細胞、任意でT細胞の機能活性と比較して、化学走性、接着、サイトカイン産生、増殖（増大）、細胞傷害活性、代謝活性の中から選択される、変更された活性を呈する、

態様163～221のいずれか1つに記載の方法。

223. 活性が、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれよりも大きく変更される、態様222に記載の方法。

224. T細胞または標的細胞の集団中に、組換えタンパク質をコードする組換え核酸分子を導入する工程をさらに含み、それによって、細胞が組換えタンパク質を発現する、態様163～223のいずれか1つに記載の方法。

225. 組換え受容体が、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックT細胞受容体（TCR）である、態様224に記載の方法。

226. インビトロまたはエキスピボで行われる、態様163～225のいずれか1つに記載の方法。

227. 培養細胞を、疾患または状態を有する対象に投与する工程をさらに含む、態様163～226のいずれか1つに記載の方法。

228. 態様163～227のいずれか1つに記載の方法によって産生された複数の培養T細胞または標的細胞、および任意で、薬学的に許容される賦形剤を含む、組成物。

229. 物質の添加後に、細胞が、30℃よりも高い温度で、24時間超、48時間超、72時間超、または96時間超にわたって、インビトロまたはエキスピボでインキュベートされていない、態様228に記載の組成物。

230. (a) 受容体結合物質に結合することができる複数の結合部位を含む、試薬；および (b) (i) 試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) 細胞においてシグナルを誘導もしくはモジュレートする、または細胞において機能活性を変更する様式でCD28、CD3、CD137、またはCD40ではない標的細胞の表面上の分子に特異的に結合することができる、受容体結合物質を含む、製造物品。

231. 受容体結合物質が、サイトカイン受容体に特異的に結合する、ケモカイン受容体に特異的に結合する、接着分子であるかもしくはそれを含む、または、サイトカイン産生、ケモカイン産生、および／もしくは接着分子の発現を誘導する因子である、態様230に記載の製造物品。

232. 受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、TNFR2、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合する、態様230または態様231に記載の製造物品。

233. 受容体結合物質が、IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1、TNFR2、IL-7R、IL-21R、およびCD132（IL受容体共通 γ 鎖）の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドであり；かつ／または

受容体結合物質が、IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF、IL-7、IL-21、およびIL-9の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様230～232のいずれか1つに記載の製造物品。

234. 受容体結合物質が、IL-12R、IFN- γ R、IL-4R、およびIL-17Rの中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、およびIL-17の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様230～232のいずれか1つに記載の製造物品。

235. 受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるケモカイン受容体に特異的に結合する、態様68または態

10

20

30

40

50

様69に記載の製造物品。

236. 受容体結合物質が、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3、およびCXCR4の中から選択されるサイトカイン受容体に特異的に結合するリガンドである；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様230、態様231、または態様235に記載の製造物品。

237. 受容体結合物質が、CXCR3、CCR7、CXCR1、およびCXCR4の中から選択されるサイトカインに特異的に結合する；または

受容体結合物質が、CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21、およびCCL25の中から選択されるリガンドであるか、もしくはそれらの生物学的に活性な断片である、態様68、態様69、態様235、または態様236のいずれか1つに記載の製造物品。

238. 接着分子が、CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-セレクトリン)、およびCD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、態様230または態様231に記載の製造物品。

239. 接着分子が、LFA-1、L-セレクトリン、VCAM-1、およびVLA-4の中から選択されるか、またはそれらの生物学的に活性な断片である、態様238に記載の製造物品。

240. 因子が核因子である、態様230または態様231に記載の製造物品。

241. 因子が、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 γ (ROR γ) またはROR α である、態様230、態様231、または態様240に記載の製造物品。

242. 受容体結合物質または作用物質が、結合パートナーC1を含み；かつ

複数の結合部位が、各々が結合パートナーC1に結合して受容体結合物質または作用物質と試薬との間に可逆的結合を形成することができる2つ以上の結合部位Z1を含む、態様230～241のいずれか1つに記載の製造物品。

243. 受容体結合物質が追加の受容結合物質であり、分子が追加の分子であり、かつ、試薬が、(c) 第1の受容体結合物質に可逆的に結合することができる複数の結合部位、および(d) (i) 試薬に可逆的に結合されており、かつ(ii) T細胞の表面上の第1の分子に特異的に結合することができる、第1の受容体結合物質をさらに含む、態様230～241のいずれか1つに記載の製造物品。

244. 第1の受容体結合物質が、TCR/CD3複合体のメンバーに特異的に結合し、かつ／または、第1の受容体結合物質が、CD3に特異的に結合する、態様243に記載の製造物品。

245. 1つまたは複数のT細胞の表面上の第2の分子に特異的に結合することができる第2の受容体結合物質の存在下で、インキュベーションがさらに実行され、該第2の分子が、任意で、第1の分子を介して送達されたシグナルを増強するか、減衰させるか、または改変するように組成物中の標的細胞においてシグナルを誘導またはモジュレートすることができる、態様243または態様244に記載の製造物品。

246. 第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナル以外のシグナルである；

第2のシグナルが、TCR/CD3複合体関連シグナルを増強もしくは強化することができる；または

第2の分子が、共刺激分子、アクセサリ分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子であるか、または、TNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーである、態様245に記載の製造物品。

247. 第2の分子が、CD28またはCD137の中から選択される、態様245または態様246のいずれか1つに記載の製造物品。

248. 第2の分子がCD28である、態様245～247のいずれか1つに記載の製造物品。

249. 試薬が、インキュベーションの少なくとも一部にわたって、支持体上に固定化されているか、または固定化されることができ、それによって、(追加の、第1のおよび／または第2の) 受容体結合物質が、支持体上に固定化されているか、または固定化されることができる、態様230～248のいずれか1つに記載の製造物品。

10

20

30

40

50

250. 支持体が、固定相であるかもしくはそれを含み；かつ／または

支持体が、固体支持体であるかもしくはそれを含む、
態様249に記載の製造物品。

251. 試薬が、前記インキュベーションの間、固体支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁性粒子、および／もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合されていないかもしくはそれらと会合しておらず；かつ／または

試薬が、柔軟性であり、金属もしくは磁性コアを含有せず、完全にもしくは主に有機多量体から構成されており、球形ではなく、実質的に球形もしくは均一な形状ではなく、かつ／もしくは硬直していない；

試薬が、20 nm未満、10 nm未満、5 nm未満、もしくは1 nm未満であるサイズを有する；
または

試薬が、1.2 g/cm³未満もしくは1.0 g/cm³未満の密度を有する、
態様230～248のいずれか1つに記載の製造物品。

252. 追加の受容体結合物質、第1の受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、各々個々に、抗体断片、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、およびそれらの結合断片の中から選択される、態様230～251のいずれか1つに記載の製造物品。

253. 追加の受容体結合物質、第1の受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、抗体断片を含む；

追加の受容体結合物質、第1の受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、Fab断片を含む；

追加の受容体結合物質、第1の受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、F(ab')₂断片および二価一本鎖Fv (scFv) 断片の中から選択される二価抗体断片である；または

追加の受容体結合物質、第1の受容体結合物質、および／または第2の受容体結合物質であることができる受容体結合物質が、Fab断片、Fv断片、およびscFv断片の中から選択される一価抗体断片である、

態様230～252のいずれか1つに記載の製造物品。

254. 試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジ類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインであるか、またはそれを含む；または

試薬が、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジ類似体もしくはムテイン、または、および、アビジン類似体もしくはムテインのオリゴマーまたはポリマーを含む、
態様230～253のいずれか1つに記載の製造物品。

255. 態様230～254のいずれか1つに記載の製造物品、および任意で使用説明書を含む、キット。

256. 受容体結合物質と試薬との間の結合を逆転させることができる物質をさらに含む、
態様255に記載のキット。

257. 物質が、ストレプトアビジン結合ペプチド、ビオチンもしくは生物学的に活性な断片、任意でD-ビオチン、またはビオチン類似体もしくは生物学的に活性な断片を含む、態様256に記載のキット。

【実施例】

【0569】

VIII. 実施例

以下の実施例は、例証目的のみで含まれ、本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【0570】

実施例1：オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬に可逆的に結合している多量体化抗CD3および抗CD28 Fab断片を含有する、可溶性刺激試薬の生成

刺激物質（抗CD3および抗CD28 Fab断片）を、オリゴマーストレプトアビジンムテイン

10

20

30

40

50

である多量体形成試薬への可逆的結合によって多量体化した。試薬は、Fab断片上に存在するペプチドタグに対する複数の結合部位を含有していた。オリゴマーストレプトアビジンムテインは、Strep-tactin（登録商標）mlと命名されているストレプトアビジンムテイン（SEQ ID NO: 6に示されるアミノ酸のムテイン配列を含有する、ストレプトアビジンホモテトラマー、例えば、米国特許第6,103,493号およびVoss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-982を参照されたい）を、スルホ-SMCC（スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、製品番号22122 Thermo Scientific）およびイミノチオラン（製品番号26101 Thermo Scientific）で、製造業者の説明書（Thermo Scientific）に従ってポリマー化することによって調製した。オリゴマーストレプトアビジンムテイン分子を、サイズ排除クロマトグラフィーによって、モノマー（未反応）およびダイマーのストレプトアビジンから分離した。

10

【0571】

抗CD3および抗CD28 Fab断片を、各Fab断片に融合させたストレプトアビジンペプチド結合パートナーを介して、オリゴマーストレプトアビジンムテインに可逆的に結合させた。抗CD3 Fab断片は、ハイブリドーマ細胞株OKT3（ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）；米国特許第4,361,549号も参照されたい）によって産生されるCD3結合モノクローナル抗体に由来し、Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)に記載されている抗CD3抗体OKT3の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含有していた。これらの配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 31および32に示される。抗CD28 Fab断片は、抗体CD28.3（合成一本鎖Fv構築物としてGenBankアクセッション番号AF451974.1で寄託されている；Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570もまた参照されたい）に由来し、それぞれ、SEQ ID NO: 33および34に示される抗CD28抗体CD28.3の重鎖および軽鎖の可変ドメインを含有していた。Fab断片を、個々に、それらの重鎖のカルボキシ末端で、アミノ酸の配列

20

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

を有する2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配置を含有するストレプトアビジンペプチド結合配列に融合させた。ペプチドタグ付加Fab断片を、組み換え生産した（国際特許出願公開第WO 2013/011011号および第WO 2013/124474号を参照されたい）。

【0572】

可逆的結合をもたらしために、ペプチドタグ付加抗CD3および抗CD28 Fab断片を、ほぼ室温で、多量体形成試薬と混合し、それにより、それらを、試薬上の結合部位に可逆的に結合することができる結合パートナーであるFab断片上のTwin-Strep-tagの間の相互作用を介して、試薬に可逆的に結合させた。具体的には、本研究において、およそ0.5 μgの抗CD3ペプチドタグ付加Fab断片およびおよそ0.5 μgの抗CD28ペプチドタグ付加Fab断片を、およそ3 μgの可溶性オリゴマーStrep-tactin（登録商標）に室温で添加した。いくつかの場合には、ペプチドタグ付加Fab断片を、可溶性オリゴマーストレプトアビジン骨格上への固定化の前にあらかじめ混合し、これは、いくつかの例において、異なるFab分子のより均一な分布を結果としてもたらしすることができる。結果として生じた可溶性抗CD3／抗CD28多量体化作用物質を、T細胞を刺激するために使用した。いくつかの場合には、結果として生じた可溶性抗CD3／抗CD28多量体化作用物質を、細胞の刺激の前に氷上で保存した。

30

40

【0573】

実施例2：可逆的物質とのインキュベーションによるT細胞の時間的に制御された刺激後の、T細胞増大の評価

T細胞を、多量体化され、可逆的に結合している作用物質（抗CD3／抗CD28 Fab断片）を含有する、実施例1に記載された試薬とインキュベートした。多量体化抗CD3および抗CD28 Fabと細胞との間の相互作用を、D-ビオチンの添加により、開始後の様々な時点で破壊した。D-ビオチンは、ストレプトアビジンムテイン上の結合パートナーに対する結合について、作用物質上のstrep-tagと競合し、それにより結合を破壊する。

【0574】

50

より詳細には、T細胞を、Ficoll勾配から得られた新鮮な末梢血単核細胞（PBMC）の試料から、CD3、CD4またはCD8の表面発現に基づいて選択した。およそ500,000個のT細胞（CD3⁺、CD4⁺またはCD8⁺のいずれか）を、50 U/mL IL-2を補給した1 mLの完全RPMI培地において、48ウェルプレートに播種した。実施例1に記載された試薬（可逆的に結合している抗CD3／抗CD28 Fabを含有する）を、概して刺激の少なくとも20分前の、細胞培養開始の日（0日目）に添加した。別の試料の細胞に、抗CD3／抗CD28ビーズ（抗CD3-mAbおよび抗CD28-mAbでコーティングされた磁気ビーズであり、その結合はD-ビオチンの添加によって破壊可能ではなく、したがって、D-ビオチンの添加で観察されたいずれかの効果が、多量体化作用物質の場合における特異的結合および破壊によったことを確認するための対照を提供した）を添加した。無処理（無刺激）の細胞が、陰性対照として役割を果たした。

10

【0575】

細胞を、合計で8日間、37℃でインキュベートした。図5Aに示されるように、D-ビオチンを、様々な時点で、多量体化抗CD3／抗CD28刺激物質とインキュベートされている細胞の組成物に、細胞に対する多量体刺激物質複合体の可逆的結合を破壊するため、多量体化抗CD3および抗CD28 Fabを通して細胞に送達されたシグナル伝達を減少させるかまたは弱めるために、添加した（1 mMの最終濃度）。具体的には、D-ビオチンを、培養ウェルに（インキュベーションの開始後1時間、1日、2日、3日、4日、もしくは5日、または採取時（8日目）のいずれかに）、1 mMの最終濃度になるように、細胞の再懸濁を伴わずに添加した。次いで、細胞を、室温で30分間インキュベートし、その後、適用可能な場合には8日目まで、37℃でインキュベーションを継続した。培養培地を、3日目および5日目に交換した。個々の試験ウェルを、再懸濁して細胞を採取し、個々に微小遠心管に移して、細胞の増大を評価するために細胞数について、および／またはCD4もしくはCD8の表面発現についてフローサイトメトリーによって、解析した。例示的な結果を、図5Bおよび5Cに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

20

【0576】

図5Bに示されるように、T細胞の多量体化抗CD3／抗CD28物質とのインキュベーション、およびその後の様々な時点でのD-ビオチン添加による破壊は、T細胞数の増加を結果としてもたらし、これは、結合の破壊を伴わない8日間のインキュベーションに少なくとも匹敵する、およびいくつかの場合には、それと比較して改善された程度までの、T細胞の増大および／または存続と一貫していた。結果により、多量体形成試薬からFabを解離させるための早い時点でのD-ビオチンの添加（概して、CD8⁺細胞については1日以内、またはCD3⁺細胞については4日以内など）は、刺激の開始後8日目の採取時に、シグナルが妨害されなかった刺激と比較してより高い、総CD3⁺細胞数および総CD8⁺細胞数を結果としてもたらしたことが示された。特に、CD8⁺ T細胞を、相互作用を破壊し、刺激性シグナルを減衰させるためのD-ビオチンの添加の前に1日間、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬で刺激した場合、採取時のT細胞数は、結合の破壊を伴わない抗CD3／抗CD28試薬の存在下でのT細胞の増大と比較して、ほぼ3倍多かった。CD4⁺細胞について、採取時の細胞の数は、特に、抗CD3／抗CD28シグナル伝達複合体が、抗CD3／抗CD28多量体化試薬での刺激後1日目および4日目の多量体化複合体の分断によって時間的に制御された時点で、破壊を伴わない抗CD3／抗CD28の存在下での刺激後に観察されたものに、概して匹敵していた。

30

40

【0577】

様々な条件下でのCD4⁺サブセットおよびCD8⁺サブセットに対する相対効果を評価するために、刺激されたCD3⁺細胞の集団におけるCD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞の割合を、フローサイトメトリーによって決定した。図5Cに示されるように、CD3⁺細胞培養物の抗CD3／CD28多量体化作用物質とのインキュベーションは、破壊が、刺激を開始した後1日以内などの、相対的により早い時点でもたらされた場合、採取時のCD4⁺細胞と比較した際、および他の条件と比較した際に、相対的により高い割合のCD8⁺細胞をもたらした。

【0578】

実施例3：可逆的物質とのインキュベーションによるCD3⁺ T細胞の時間的に制御された活

50

性化後の、T細胞の増大および表現型の評価

D-ビオチンでの破壊を介した、実施例1および2に記載された試薬を用いたT細胞刺激の時間的制御の影響を、評価した。本研究においては、バルクCD3⁺ T細胞を、実施例1および2に記載されたように選択し、多量体化CD3／CD28物質または様々な対照試薬の1つとインキュベートした。図6Aに示されるように、D-ビオチンを、実施例2に記載されたように、ある特定の試料に添加し、他のものには添加せず、細胞を、刺激の開始後8日目まで（3日目に培地交換して）培養した。無処理（無刺激）の細胞が、陰性対照として役割を果たした。細胞を、3日目に培地交換して、37℃でインキュベートした。7日後、個々の試験ウェルを、再懸濁して細胞を採取し、個々に微小遠心管に移して、細胞の存続および／もしくは増大を評価するために細胞数について、ならびに／または、様々なマーカー（例えば、CD4、CD8、CD62L、およびCD127）の表面発現ならびに／もしくはKi-67およびT-betの核発現を評価するためにフローサイトメトリー解析によって、解析した。例示的な結果を、図6B～6Fに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

【0579】

図6Bに示されるように、結果により、開始後1日目の破壊によって時間的に制御された、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬での細胞の刺激後の、採取時のCD3⁺ T細胞のより多い数が、シグナルの時間的制御を伴わずに（すなわち、D-ビオチン添加なし）、そのような試薬と同様の条件下で培養された細胞と比較した際に、示された。可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬とのインキュベーションを開始した1日後のD-ビオチンの添加を介した、時間的制御を伴う刺激後の、採取時のCD3⁺ T細胞の、可逆的結合の破壊を伴わずに、抗CD3／抗CD28ビーズまたは可溶性試薬の存在下で刺激された細胞と比較して、およそ3倍多い数が観察された。追加的に、D-ビオチンの添加は、抗CD3／抗CD28ビーズで刺激された培養物の場合に、採取時の細胞数に対して実質的な効果を有さず、可溶性試薬に対するD-ビオチンの添加で観察された効果は、この試薬の構成成分に特異的に結合し、その結合を破壊するその能力によったことが示された。

【0580】

増大したCD3⁺集団内で、可溶性試薬との培養および1日目のD-ビオチン破壊を用いた時間的制御の後に、採取時のCD8⁺細胞の、他の試験された条件と比較した際により高い割合が観察された（図6C）。図6Dに示されるように、CD3⁺ T細胞集団内のCD4⁺サブセットおよびCD8⁺サブセットを、無刺激対照におけるCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の比に対して正規化して、可溶性試薬の結合をD-ビオチンを用いて1日目に破壊した場合、CD4⁺ T細胞と比較した際のCD8⁺ T細胞の相対的な増大（および／または生存）の程度は、他の試験された条件と比較した際により大きかったことが、結果により示された。結果により、混合細胞培養物（例えば、バルクT細胞）において、例えば、競合物質を用いた多量体化作用物質の結合の破壊によるシグナルの時間的制御を、他のものと比較した特定の亜集団の相対的な増大および／または存続（例えば、CD4⁺対CD8⁺）をあつらえるかまたは加減するために使用できることが実証される。

【0581】

この研究からの結果によりまた、この可逆的試薬を用いてCD3／CD28シグナルを時間的に制御する能力をまた、異なる活性化、分化、および表現型プロファイルを有する様々な細胞集団の、採取時の組成物において、相対的表示に影響を及ぼすために使用できることも示された。例えば、図6Eに示されるように、CD3⁺ T細胞を、1日目のD-ビオチンの添加を伴い、8日にわたって可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬で刺激することは、細胞が、破壊による時間的制御を伴わずに同じ期間にわたって培養された他の条件と比較した際に、より高いパーセンテージのCD4⁺細胞およびより高いパーセンテージのCD8⁺細胞がCD62LおよびCD127の高い表面発現を示した最終組成物を、結果としてもたらした。同様に、図6Fに示されるように、シグナルが妨害されなかった条件と比較した際に、1日目の破壊を伴う多量体化試薬での刺激後に、採取時のCD4⁺細胞およびCD8⁺細胞の両方のより高いパーセンテージが、増殖を示すマーカーKi-67について（高染色集団よりもわずかに低いレベル

で)陽性であり、かつ低レベルのT-bet染色を呈した。これらの知見は、提供される試薬の態様を用いてシグナルを時間的に制御する能力が、長命メモリーT細胞などの、あまり分化していない、長命の集団T細胞の増加を結果としてもたらすことができるという結論と一貫している。理論によって束縛されず、CD62LおよびCD127のより高い発現は、概して、あまり分化していない、かつ／または相対的に長命のT細胞集団、例えば、セントラルメモリー(T_{CM})などのナイーブかつ長寿命のメモリー集団、およびいわゆる幹メモリーT細胞(T_{SCM})などのあまり分化していないメモリーT細胞上で観察される。対照的に、これらのマーカーは、概して、エフェクター細胞、または最終分化したエフェクターメモリーT細胞上でより低い。Ki-67陽性は、細胞増殖を示し、増加した集団内の少なくともいくつかの細胞が、ナイーブT細胞とは対照的に、長命の、あまり分化していないメモリー細胞に相当し得ることが示唆される。T-bet染色は、概して、活性化時に増加し、あまり分化していない細胞において低減しており、かつ、長命セントラルメモリーT細胞においてより低く、 T_{SCM} 細胞においてさらにより低いとして報告されている。したがって、結果により、本研究において、1日目に多量体化試薬を分断することによるシグナルの時間的制御は、長命の、あまり分化していないメモリー細胞上に存在するものに類似した表現型マーカープロファイルを有する細胞の存続、増大、および／または出現の増加(破壊を伴わない同様の刺激と比較して)を結果としてもたらしたことが示された。このように、可逆的試薬を用いて時間的に制御された刺激後に採取された細胞の増加したパーセンテージは、T幹メモリー細胞(T_{SCM})を含む長命メモリー細胞の特徴を呈し得る。

【0582】

実施例4：可逆的物質とのインキュベーションによるCD8⁺ T細胞の時間的に制御された活性化後の、T細胞増大および表現型の評価

CD4⁺細胞の実質的な存在を伴わないCD8⁺細胞に対する影響を評価するために、本質的に実施例3におけるようであるが、バルクCD3⁺細胞の刺激とは対照的に、培養細胞をCD8⁺細胞について濃縮して、研究を実行した。例示的な結果を、図7A~7Cに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

【0583】

図7Aに示されるように、CD3⁺バルク培養物についての場合のように、細胞数は、1日目のシグナルの妨害後の細胞の、D-ビオチンが添加されなかったか、またはシグナルが別の様式で妨害されなかった時の対応する条件と比較した際に、増加した生存および／または増大を示した。細胞数および相対的な増大または存続の増加は、バルクCD3⁺細胞について観察されたものと類似しており、再び、Dynabead(登録商標)対照試料に対するD-ビオチンの添加により、多量体化試薬構成成分の結合の破壊による効果の特異性が示された。

【0584】

図7Bおよび7Cに示されるように、実質的なCD4⁺細胞の非存在下においてさえも、本研究における時間的に制御された条件は、長命メモリー細胞および／またはあまり分化していない細胞に類似した表現型特性を呈する、採取時のT細胞の増加した表示を結果としてもたらした。

【0585】

実施例5：CD3および様々な共刺激分子を標的とするように官能化された可溶性多量体化試薬でのT細胞の刺激後の、T細胞刺激の評価

代替的な刺激物質およびそれらの組み合わせとのインキュベーション後に細胞を評定する、追加的な研究を実行し、提供される試薬のいくつかの態様について、所望の成果または表現型を促進するためのアウトプット組成物を設計または加減するために、試薬のモジュラー特性を使用できることを例証した。抗CD3 Fabおよび1つまたは2つの追加的なFabを含有する様々な多量体化作用物質を、記載された抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabに加えて、T細胞においてシグナルを送達するか、モジュレートするか、または増すことができる追加的なFab(抗CD90、抗CD95、抗CD137、および抗CD154)を使用したことを除いて、実施例1に記載されたように生成させた。異なる条件について、Fabを、様々な二重および三重の

組み合わせにおいて、試薬に可逆的に結合させた。

【0586】

様々なFabでの試薬の官能化を、Fabとオリゴマー試薬とを室温で混合して、本質的に実施例1に記載されたように実行した。2つの異なるFabを多量体形成するためには（二重Fabの組み合わせ）、およそ3 μ gのオリゴマーStrep-tactin（登録商標）を、およそ0.5 μ gの各Fabと混合し；同じ試薬上に3つの異なるFabを多量体形成するためには（三重Fabの組み合わせ）、およそ4.5 μ gの可溶性オリゴマーStrep-tactin（登録商標）を、抗CD3 Fab、抗CD28 Fab、および追加的なFab（CD90、CD95、CD137、またはCD154を標的とする）のうちの1つを含有する三重Fab多量体化作用物質の生成のために、およそ0.5 μ gの各Fabと混合した。結果として生じた可溶性多量体化試薬を、T細胞を刺激するために直接使用したか、任意で、細胞の刺激の前に氷上で保存した。

10

【0587】

CD3+ T細胞を、実施例1に記載されたように単離して、500,000個のCD3+ T細胞を、50 U/mL IL-2を補給した1 mLの完全細胞培養培地において、48ウェルプレートに播種した。細胞を、様々な可溶性Fab多量体化作用物質のうちの1つ、または抗CD3／抗CD28ビーズ（抗CD3-mAbおよび抗CD28-mAbでコーティングされたビーズ）のいずれかで刺激した。無処理（無刺激）の細胞が、陰性対照として役割を果たした。細胞を、開始後2日目に培地交換して、37°Cでインキュベートした。6日後に、個々の試験ウェルを、再懸濁して細胞を採取し、個々に微小遠心管に移して、細胞の増大を評価するために細胞数について、および／または、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD69、もしくはCD62Lの表面発現についてフローサイトメトリー解析によって、解析した。例示的な結果を、図8A～8Fに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

20

【0588】

図8Aに示されるように、Fab多量体化作用物質の各々でのCD3+ T細胞の刺激は、抗CD3／抗CD28、抗CD3／抗CD28ビーズでの刺激に少なくとも匹敵し、いくつかの場合にはより高かった、採取時の細胞数（増大および／または存続を示す）を結果としてもたらした。抗CD28 Fabを含有しなかったFab多量体化作用物質での刺激は、増大した培養物のT細胞組成を、例えば抗CD3／抗CD28ビーズまたは可溶性抗CD3／抗CD28多量体化作用物質での刺激による、抗CD28 Fabを含んだ試薬での細胞の刺激と比較して、CD8+細胞のより高い割合に向かってシフトさせた。例えば、図8Bに示されるように、CD3+ T細胞集団内のCD4+サブセットおよびCD8+サブセットを、無刺激対照におけるCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞の比率に対して正規化して、結果により、CD8+ T細胞の数の相対的增加がCD4+ T細胞の相対的增加よりも大きかったことが、多量体化抗CD3 Fab、および多量体化抗CD90、抗CD95、抗CD137、または抗CD154 Fabのいずれかを含有する多量体試薬で刺激された培養物について示されたが、多量体化抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabを含有するそのような試薬で刺激されたもの、または抗CD3／抗CD28ビーズで刺激されたものについては示されず、多量体化Fabのうちの1つが抗CD28 Fabであった、3つの多量体化Fabを含有するものは、増大したT細胞組成物においてCD8+細胞のより大きな割合をもたらさなかった。

30

【0589】

図8Cおよび8Dに示されるように、本研究における条件下で、抗CD28 Fabを含むもの以外の多量体化Fabの組み合わせの使用は、抗CD28 Fabを含む同様の刺激条件および作用物質と比較した際に、CD62L+であった細胞の相対的により大きなパーセンテージを、結果としてもたらすように見られた。この効果は、CD3+ T細胞集団内のそれぞれのサブセットを正規化した後に、採取時の細胞のCD4++（図8C）およびCD8+（図8D）集団の両方において観察された。図8E（CD4+ T細胞）および図8F（CD8+ T細胞）は、様々な条件におけるCD62L、CD69、CD45RA、およびCD45ROの発現を示す。これらの結果により、本明細書中で提供される態様において、試薬のモジュラー性質が、刺激物質（CD28以外のもの（例えば、CD90、CD95、CD137、もしくはCD154）を含む、様々な第2のまたはアクセサリシグナル伝達分子を標的とするものを含む）の異なる組み合わせの使用を通してを含み、所望の成果、

40

50

細胞集団、および表現型のための試薬のあつらえを可能にすることが実証される。いくつかの局面において、そのようなあつらえを使用して、所望の表現型の産生に向かって、例えば、長命メモリーT細胞などのあまり分化していない表面表現型を有する細胞を促進するために、培養物をシフトさせることができる。

【0590】

実施例6：T細胞刺激に対する、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬のムテインストレプトアビジン骨格の効果

SEQ ID NO:27に示されるアミノ酸のムテイン配列を含有するストレプトアビジンホモテトラマーである代替的なストレプトアビジンムテイン（例えば、国際公開されたPCT出願第WO 2014/076277号）を使用して、実施例1に記載されたものと実質的に同じである方法を用いて、可溶性オリゴマー試薬を生成した。抗CD3および抗CD28 Fab断片を、実質的に実施例1に記載されたように、各Fab断片に融合させたストレプトアビジンペプチド結合パートナーを介して、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインに固定化した（ST-MM B）。結果として生じた抗CD3／CD28 Fab多量体化試薬（ST-MM B）でのT細胞の刺激を、実施例1において生成された抗CD3／CD28 Fab多量体化試薬（本明細書において比較のためにST-MM Aと命名される）でのT細胞の刺激と比較した。

【0591】

CD3+ T細胞を、Ficoll勾配から得られた新鮮な末梢血単核細胞（PBMC）の試料から選択した。およそ500,000個のCD3+ T細胞を、50 U/mL IL-2を補給した1 mLの完全細胞培養培地において、48ウェルプレートに播種した。細胞を、実施例1に記載されたように生成された可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）、または抗CD3／抗CD28ビーズ（抗CD3-mAbおよび抗CD28-mAbでコーティングされたビーズ；陽性対照）のいずれかで刺激した。無処理（無刺激）の細胞が、陰性対照として役割を果たした。細胞を、培地交換をせずに、37℃でインキュベートした。5日後に、個々の試験ウェルを、再懸濁して細胞を採取し、個々に微小遠心管に移して、細胞の増大を評価するために細胞数について、および／または、CD4、CD8、CD69、もしくはCD62Lの表面発現についてフローサイトメトリー解析によって、解析した。例示的な結果を、図9A～9Dに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

【0592】

図9Aに示されるように、結果により、CD3+ T細胞の可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）または可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）のいずれかで刺激は、同等の細胞の増大を結果としてもたらし、それは、抗CD3／抗CD28ビーズでの刺激で達成されたものよりも大きかったことが示された。図9Bにおける結果により、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）での細胞の刺激は、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）での細胞の刺激と比較して、増大した培養物のT細胞組成において、CD8+細胞の割合の小さな増加をもたらしたことが示された。図9Cに示されるように、CD3+ T細胞集団内のCD4+サブセットおよびCD8+サブセットを、無刺激対照におけるCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞の比率に対して正規化して、CD8+ T細胞の増大が、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）または抗CD3／抗CD28ビーズでと比較して、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）で刺激された細胞において、CD4+ T細胞の増大よりも実質的に大きかったことが、結果により示された。図9Dにおける結果によりまた、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）で刺激された細胞は、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）または抗CD3／抗CD28ビーズのいずれかで刺激された細胞と比較して、増大した培養物のT細胞組成を、CD62L+細胞のより高い割合に向かってシフトさせたことも示された。

【0593】

特にCD8+細胞に対する試薬ST-MM Bの効果を評価するために、同様の実験を、刺激を6日目まで進行させ、培地交換を含めたことを除いて、上記のように行った。特に、およそ500,000個のCD8+ T細胞を、50 U/mL IL-2を補給した1 mLの完全細胞培養培地において、48

10

20

30

40

50

ウェルプレートに播種した。細胞を、実施例1に記載されたように生成された可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）、または抗CD3／抗CD28ビーズ（抗CD3-mAbおよび抗CD28-mAbでコーティングされたビーズ；陽性対照）のいずれかで刺激した。無処理（無刺激）の細胞が、陰性対照として役割を果たした。細胞を、4日目に培地交換して、37℃でインキュベートした。6日後に、個々の試験ウェルを、再懸濁して細胞を採取し、個々に微小遠心管に移して、細胞の増大を評価するために細胞数について、および／または、CD8、CD69、もしくはCD62Lの表面発現についてフローサイトメトリー解析によって、解析した。例示的な結果を、図10Aおよび10Bに示す。データは、各々の試験された条件および対照について二連を包含する、3回の独立した実験を代表するものである。

10

【0594】

図10Aに示されるように、結果により、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）でのCD8+ T細胞の刺激は、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）または抗CD3／抗CD28ビーズで刺激されたCD8+ T細胞と比較して、2倍よりも大きい細胞数の増加を結果としてもたらしたことが示された。図10Bにおける結果は、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM A）または抗CD3／抗CD28ビーズのいずれかで増大したT細胞に対する、可溶性抗CD3／抗CD28多量体化試薬（ST-MM B）で増大したT細胞におけるCD62L+およびCD69+のT細胞組成物の表面発現の程度を含む、細胞の表面表現型を示す。

【0595】

実施例7：ストレプトアビジンムテインStrep-tactin（登録商標）でコーティングされたビーズ上に可逆的に固定化されたαCD3/αCD28 Fab断片によるCD3+ Tレスポンダー細胞の刺激／増大

20

300,000個のCD3+CD62L-レスポンダーT細胞（Tresp、非動員ドナーアフェレーシス生成物から連続磁気濃縮によって単離）を3μM CFSEで標識し、0.5μg αCD3 Fab断片のみ、0.5μg αCD28 Fab断片のみ、または0.5μg αCD3 Fab断片と0.5μg αCD28 Fabとの混合物のいずれかが負荷されたStreptactin（登録商標）ビーズの調製物 15μl（10 mg磁気粒子/ml、35μg Streptactin（登録商標）/mgビーズが負荷された）のうちの5μlで刺激した。

【0596】

使用したαCD3 Fab断片は、ハイブリドーマ細胞株OKT3によって産生されるCD3結合モノクローナル抗体に由来した。ハイブリドーマ細胞株OKT3およびOKT3抗体は、米国特許第4,361,549号に記載されており、この細胞株はアクセッション番号ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）の下で寄託されている。使用したαCD28 Fabは、モノクローナル抗ヒトCD28抗体 CD28.3（Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570）に由来した。この抗体CD28.3の可変ドメインのヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号AF451974.1の下、合成一本鎖Fv構築物抗ヒトCD28抗体scFv28.3の形態で、GenBankに寄託されている（SEQ ID NO: 33および34に記載）。

30

【0597】

両Fab断片は、定常ドメイン（CH1およびCカッパ）としてIgG1コンセンサス配列を有して、国際特許出願公開WO2013/011011およびWO 2013/124474に記載されているように、大腸菌において組換えによって産生させた。両Fab断片の重鎖を、IBA GmbH, Göttingen, Germanyから「Twin-Strep-tag（登録商標）」として市販されている、2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配置

40

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)(SEQ ID NO: 16)

とカルボキシ末端で融合させた。αCD3 Fab断片を、結合パートナーC1として機能するストレプトアビジン結合ペプチドを有する第1作用物質として使用し、αCD28 Fab断片を、結合パートナーC2として機能するストレプトアビジン結合ペプチドを有する第2作用物質として使用した。（四量体）ストレプトアビジンムテイン「Strep-tactin（登録商標）」は、両Fab断片が可逆的に固定化された試薬として機能する。

【0598】

50

増大実験において、ブランクビーズ（Fabなし）で刺激したTresp細胞を陰性対照とした。Tresp細胞を、10U/mlインターロイキン2（IL-2）を補充した完全細胞培養液（10%（v/v）ウシ胎仔血清、L-グルタミン、b-メルカプトエタノール、HEPES、ペニシリン、ストレプトマイシン、およびゲンタマイシンを補充したRPMI（Gibco））3ml中に、300,000個のCD3細胞自己フィーダー細胞（30Gyで照射）と共に48ウェルプレートに3つ組で播種した。細胞を、培地交換せずに37℃でインキュベートし、4日後にFACS解析によって解析した。100 μM D-ビオチンと共に10分間インキュベートした後に、FACS染色および解析を行った。各条件につき1つの代表的なプロットを図11Aに示す。プロットは、生／死を判別するためにヨウ化プロピジウム（PI）で染色した生存CD3+細胞を示す。図11Aは、刺激された細胞のサイズ分布（前方散乱）を示すヒストグラムである。図11Aは、ストレプトアビジンム
10
テインStrep-tactin（登録商標）でコーティングされたビーズ上に可逆的に固定化されたαCD3/αCD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した後、0.5 μg αCD3 Fab断片と0.5 μg αCD28 Fabとの混合物が固定化されたビーズの存在下でインキュベートした場合に、Tresp細胞の特定の細胞集団が刺激され、増大した（刺激されていない「ビーズのみ」の対照と比較してサイズ／数が増加）ことを示す。図11Bは、細胞分裂当たりの細胞数に従って増殖の程度を表す増殖色素CFSEの希釈度のヒストグラムを示す（図11Bの上部に示されている0は、分裂していない細胞を表し；5は少なくとも5回分裂した細胞を表す）。図11Bから、0.5 μg αCD3 Fab断片と0.5 μg αCD28 Fabとの混合物が固定化されたビーズで刺激されたT細胞の集団のほとんどが、3回細胞分裂しており、単一の刺激のみよりも均一な増殖パターンを表す（分裂していないピーク「0」内の細胞数が少ない）ことがわかる。増殖の絶対量の増加（αCD3およびαCD28機能化ビーズで4日間刺激した後、より多くの細胞が均一に増殖した）もまた、指示薬の色が黄色に変化したことによって示される（図11Cにおいてウェル中のより明るい液体として示される）通り、より著しい培地の消費によって表される。

【0599】

実施例8：可溶性Strep-tactin上に可逆的に固定化されたαCD3/αCD28 Fab断片によるCD3 + Tレスポonder細胞の刺激／増大

本実施例では、CD3+ Tレスポonder細胞（フィコール勾配から得られた新たなPBMCの試料から磁気選択によって単離）を、可溶性試薬として作用する可溶性オリゴマーStrep-tactin（登録商標）上に可逆的に固定化されたαCD3/αCD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した後、増大した。オリゴマーストレプトアビジンムテインは、製造業者（Thermo Scientific）のプロトコルに従って、Strep-tactin（登録商標）をスルホ-SMCC（スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸、製品番号22122 Thermo Scientific）およびイミノチオラン（製品番号26101 Thermo Scientific）と重合させることによって得た。サイズ排除クロマトグラフィーによって、単量体（未反応）および二量体のストレプトアビジンムテインからオリゴマーストレプトアビジンムテインを分離し、このようにして得られたオリゴマーストレプトアビジンムテイン（n≥3）の画分を可溶性試薬として使用した。

【0600】

インビトロ増大のために、300,000個のCD3+レスポonderT細胞（Tresp）を2 μMカルボキシフルオロセインスクシンイミジルエステル（CFSE）で標識し、上記のαCD3 OKT3 Fab断片と抗体28.3のαCD28 Fab断片（いずれも重鎖において、ストレプトアビジン結合ペプチドとして上述のTwin-Strep-tag（登録商標）を有する）との組み合わせが固定化された可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物の様々な量で刺激した。（「1x」は、0.5 μg αCD3単量体Fab断片および0.5 μg αCD28単量体Fab断片で機能化された3 μgオリゴマーストレプトアビジンムテインに相当し、「0.5x」、「2x」、および「5x」という数字は、それぞれ「1x」のn倍量を示す）。刺激しない状態のまま、またはブランクオリゴマーストレプトアビジンムテイン（Fabなし）で刺激したTresp細胞を陰性対照とした。Tresp細胞を、20U/ml IL-2を補充した細胞培養液1 mL中に、300,000個のCD3陰性自己フィーダー細胞（30Gyで照射）と共に48ウェルプレートに2つ組で播種した。培地交換せず
40
50

に細胞を37℃でインキュベートし、5日後にFACS解析によりCFSE希釈度に従って増殖を解析した。図12Aは、陰性対照と比較した、5日間培養した後の増殖細胞のサイズ分布の増加を示す。図12Bは、 α CD3 Fab断片と α CD28 Fab断片との混合物が固定化された可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインと共にインキュベートした場合に（実施例7および図11(A~C)における固体Streptactin磁気粒子と比較して）、CD3+ Tresp細胞が適切に刺激され、活発に増殖したことを示す。図12Aおよび図12Bにおける結果は、これらのインビトロ条件下で、表面CD28およびTCR/CD3複合体と、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に可逆的に固定化された α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片との会合後に、CD3+ Tレスポンドー細胞の大部分が分裂した（2~5回の細胞分裂）ことを示す。インビトロ増大後、可溶性多量体化作用物質を、D-ビオチン処理後に解離させ除去した。フィコエリトリン標識Strep-Tactin（登録商標）（ST-PE）で細胞を再染色することによって、単量体Fab断片の解離および除去をフローサイトメトリーで解析した。適切なST-PEのみの陰性対照（薄い灰色のヒストグラム）と比較した、代表的なヒストグラム（濃い灰色のヒストグラム）を示す。図12Cから、両Fab断片が完全に解離し、増大した細胞から完全に除去されたことがわかる。図12Dは、5日後の生存（トリパンプルー陰性）細胞の絶対数を示す。ノイバウエル計数チャンバーを用いて数を計数し、それぞれの刺激条件に対してプロットした。細胞数中央値を図12Dに示し；エラーバーは標準偏差（SD）を示す。図12Dは、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬上に固定化された α CD3 Fab断片と α CD28 Fab断片との混合物がすべて、CD3+細胞の増大において同等に効果的であり、絶対細胞数のおよそ4倍の増加をもたらしたことを示す。

【0601】

実施例9：培地交換せずに、可逆的 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer多量体でインビトロにおいて刺激した精製CD4+ Tレスポンドー細胞およびCD8+ Tレスポンドー細胞の増殖の動態

本実施例では、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した精製CD4+ Tレスポンドー細胞およびCD8+ Tレスポンドー細胞（Tresp）の増殖の増大動態を調べた。この目的のために、2つの異なるサイズの可溶性オリゴマーStrep-tactin（登録商標）ムテインが、可溶性試薬としての役割を果たした。第1の種類のオリゴマーStrep-tactin（登録商標）は、実施例8で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテイン（ $n \geq 3$ ）の画分であった（本明細書では「従来のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格」とも称される、図13(A~B)では先端が上を向いている三角形記号によって示される）。可溶性試薬として使用された第2の種類のこのオリゴマーストレプトアビジンムテインは、ビオチン化ヒト血清アルブミンと反応させたオリゴマーストレプトアビジンムテイン（ $n \geq 3$ ）であった（本明細書では「大きなオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格」とも称される）。

【0602】

本実施例では、500,000個の精製CD4+レスポンドーT細胞またはCD8+レスポンドーT細胞（Tresp）を、上記の通りのこれら2つの異なるStreptamer多量体で、すなわち実施例8のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格（1 mgオリゴマーストレプトアビジンムテイン/mlの濃度を有する溶液を使用）または大きなオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格（0.1mg/ml）のいずれかで別々に刺激した。異なる両骨格3 μ lに、Fab断片の重鎖のC末端においてストレプトアビジン結合ペプチド

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

を有する、上記実施例で使用された0.5 μ g α CD3 Fabと0.5 μ g α CD28 Fabとの組み合わせを負荷した。加えて、4.5 μ lの従来のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格に、0.5 μ g α CD3 Fab断片、0.5 μ g α CD8 Fab断片（IBA GmbH Gottingen、これも同様にFab断片のC末端においてストレプトアビジン結合ペプチド

SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

を有する）、および0.5 μ g α CD28 Fab断片を負荷した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、市販の抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3モノクローナル抗体および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されているビーズ）で刺激したTresp細胞を陽性対照

とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液（10%（v/v）ウシ胎仔血清、0.025%（w/v）L-グルタミン、0.025%（w/v）L-アルギニン、0.1%（w/v）HEPES、0.001%（w/v）ゲンタマイシン、0.002%（w/v）ストレプトマイシン、0.002%（w/v）ペニシリンを補充したRPMI 1640（Gibco）1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種した。培地交換せずに細胞を37℃でインキュベートし、1日、3日、および6日後に細胞数を解析した。図13(A～B)の実験では、培地交換せずに増大を実施した。CD4+ Tレスポンドー細胞についての結果を図13Aに示し、CD8+ Tレスポンドー細胞についての結果を図13Bに示し、グラフは、CD4+ Tresp（図13A）および図13BにおけるCD8+ Trespについて、時点ごとに収集された細胞の数に従った増殖の程度を表す。

【0603】

図13Aからわかるように、 α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片が可逆的に固定化された「より小さな」可溶性試薬は、抗CD3／抗CD28ビーズ（T細胞の増大について今までのところ標準的な試薬である）と同じ量のCD4+ T細胞の増大をもたらしたのに対して、「より大きな」多量体化作用物質は、Dynabeadと比較してさらにより優れた増大をもたらした。この改善は、「より小さな」多量体化作用物質よりも多くのT細胞に同時に結合することができ、それによって「より小さな」多量体化作用物質よりも多くのCD4+ T細胞を刺激することができる、可溶性の「より大きな」多量体化作用物質によって引き起こされた可能性がある。

【0604】

図13Bから明らかであるように、本明細書において開示される可溶性多量体化作用物質を用いると、最初の3日以内は少なくとも抗CD3／抗CD28ビーズと同程度効率的にCD8+ T細胞を増大することができた。注目すべきことには、この期間において、（第1作用物質および第2作用物質としての） α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片に加えて、可逆的に固定化された α CD8 Fab断片を有する可溶性試薬を使用した増大実験が、これらの培養条件下で最大の増大度を示した。このことは、細胞の特定の亜集団に特異的な刺激（この場合 α CD8 Fab断片）を用いることによって、増大の選択性を高めるまたは調節することが可能であり、それによってより多くの量の所望の細胞（亜）集団を得ることができることを示す。

【0605】

したがって、上記を要約すると、実施例9は、T細胞の増大を誘発するという観点での可溶性多量体化作用物質の機能性が、この目的のために抗CD3／抗CD28ビーズを使用する現行の標準的な方法論に匹敵することを示す。しかしながら、第1作用物質および第2作用物質と試薬との間のストレプトアビジンベースの可逆的相互作用の場合には、ビオチンなどの競合物を添加することによって刺激を制御する（および必要に応じて終了させる）ことができるため、本明細書において記載される組成物および方法は、増大条件を最適化できる（例えば、図13Bの実験において3日後に刺激を停止することが可能である）という理由で抗CD3／抗CD28ビーズ技術よりも大きな利点をもたらす。加えて、可溶性試薬は、（例えば、増大反応後、ビオチン化カラムに試薬を固定化することによって）反応物から容易に除去することができるため、本明細書において開示される増大方法は、抗CD3／抗CD28ビーズなどのビーズの除去に対処する必要なく、例えば治療目的のための細胞のGMP生成に必要とされる閉鎖系において実施および自動化することができる。

【0606】

実施例10：培地交換して、可逆的 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer多量体でインビトロにおいて刺激した精製CD4+ Tレスポンドー細胞およびCD8+ Tレスポンドー細胞の増殖の動態

本実施例では、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した精製CD4+ Tレスポンドー細胞およびCD8+ Tレスポンドー細胞（Tresp）の増殖の増大動態を調べた。この目的のために、2つの異なるサイズの可溶性オリゴマーStrep-tactin（登録商標）ムテインが、可溶性試薬としての役割を果たした。第1の種類のオリゴマーStrep-tactin（登録商標）は、実施例8で得られたオリゴマーストレプトアビジンムテイン（ $n \geq 3$ ）の画分であった（本明細書では

10

20

30

40

50

「従来のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格」とも称される、図14(A~B)では先端が下を向いている三角形記号によって示される)。可溶性試薬として使用された第2の種類のこのオリゴマーストレプトアビジンムテインは、実施例8で得られたオリゴマーStrept-tactin ($n \geq 3$) をビオチン化ヒト血清アルブミンと反応させることによって得られた。この可溶性オリゴマー試薬は、本明細書において「大きなオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格」とも称される。

【0607】

本実施例では、400,000個の精製CD4+レスポンダーT細胞またはCD8+レスポンダーT細胞(Tresp)を、上記の通りのこれら2つの異なるオリゴマーストレプトアビジンムテインで、すなわち実施例8のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格 (1.0 mg/ml) または大きなオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格 (0.1mg/ml) のいずれかで別々に刺激した。異なる両骨格3 μ lに、上記の0.5 μ g α CD3 Fab断片と0.5 μ g α CD28 Fab断片との組み合わせを負荷した。加えて、4.5 μ lの実施例8のオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格に、上記のように0.5 μ g α CD3 Fab断片、0.5 μ g α CD8 Fab断片、および0.5 μ g α CD28 Fab断片を負荷した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3モノクローナル抗体および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されている）で刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種した。3日目に培地交換しつつ細胞を37°Cでインキュベートし、1日、3日、および6日後に細胞数を解析した。CD4+ Tレスポンダー細胞についての結果を図14Aに示し、CD8+ Tレスポンダー細胞についての結果を図14Bに示し、グラフは、CD4+ Tresp（図14A）およびCD8+ Tresp（図14B）について、時点ごとに収集された細胞の数に従った増殖の程度を表す。

【0608】

図14Aからわかるように、 α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片が可逆的に固定化された可溶性試薬（多量体化作用物質）は、抗CD3／抗CD28ビーズよりも優れたCD4+ T細胞の増大をもたらした。

【0609】

図14Bから明らかであるように、多量体化作用物質を用いると、最初の6日以内は少なくとも抗CD3／抗CD28ビーズと同程度効率的にCD8+ T細胞を増大することができた。注目すべきことには、この期間において、（第1作用物質および第2作用物質としての） α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片を有する、より大きな可溶性試薬を使用した増大実験が、これらの培養条件下で最大の増大度を示した。これもまた、「より小さな」多量体化作用物質よりも多くのT細胞に同時に結合することができ、それによって「より小さな」多量体化作用物質よりも多くのCD4+ T細胞を刺激することができる、可溶性の「より大きな」多量体化作用物質によって引き起こされた可能性がある。

【0610】

実施例11：培地交換を伴うまたは伴わない、精製CD4+ T細胞培養物およびCD8+ T細胞培養物の増大動態

本実施例では、「より小さな」多量体化作用物質ならびに陽性対照および陰性対照について、実施例9および10の統合データを投入細胞数に対して正規化した。「より大きな」多量体化作用物質に関して、正規化データは得られなかった。実施例9および10においてに説明したように、400,000~500,000個のCD4+レスポンダーT細胞またはCD8+レスポンダーT細胞(Tresp)を、多量体化作用物質の調製物 (1mg/ml ; 0.5 μ g α CD3 Fab断片および0.5 μ g α CD28 Fab断片が固定化されている) 3 μ lで刺激した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズで刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種した。3日目に培地交換しつつ（図15(A~B)における直線）または培地交換せずに（図15(A~B)における破線）細胞を37°Cでインキュベートし、1日、3日、および6日後に細胞数を解析した。図15Aの正規化データから明らかであるように、抗CD3／抗CD28ビーズを用いる増大は約1.8倍の増大率をもたらしたのに対して、 α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片が

可逆的に固定化された「より小さな」可溶性試薬は、CD4+ T細胞の約2.5倍の増大をもたらした。したがって、多量体化作用物質を使用することで、抗CD3／抗CD28ビーズよりも、CD4+ T細胞の増大はさらに改善される。同様に、図15Bにより、多量体化作用物質を用いて、最初の3日以内は少なくとも抗CD3／抗CD28ビーズと同程度効率的にCD8+ T細胞を増大することができたことが確認される。

【0611】

実施例12：ポリクローナル活性化／増大されたバルクCD3+セントラルメモリーT細胞 (T_{CM}) の増大動態および表現型

本実施例では、500,000個のCD3+CD62L+CD45RA-レスポンダー T_{CM} 細胞 (Tresp) を、0.5 μ g α CD3 Fabと0.5 μ g α CD28 Fabとの組み合わせが負荷された実施例8の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物 (1mg/ml) 3 μ lで刺激した。さらに、0.5 μ g α CD3 Fab、0.5 μ g α CD8 Fab、および0.5 μ g α CD28 Fabが負荷されたオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物4.5 μ lをさらなる刺激条件として使用した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3モノクローナル抗体および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されている）で刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2のみまたは30U/ml IL-2および5ng/ml IL-15を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種した。3日ごとに培地交換しながら細胞を37℃でインキュベートし、7日および14日後に細胞数を解析した。グラフは、図16AのIL-2のみを補充した培地および図16BのIL-2およびIL-15を補充した培地における、時点ごとに収集された細胞の数に従った増殖の程度を表す。図16Aおよび図16Bの両方からわかるように、 α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片が可逆的に結合している可溶性試薬は、抗CD3／抗CD28ビーズよりも優れた細胞増大をもたらす。図16Cの、可変サイトカイン環境中で14日間培養した後のCD62LおよびCD127表面発現のフローサイトメトリー解析によってさらに示されるように、多量体化作用物質を使用する実験アプローチは、本明細書で選択された両条件下で、抗CD3／抗CD28ビーズを用いる増大よりも高い含有量のCD127発現長寿命メモリーT細胞を保持する。このことは、本発明の組成物の方法および本明細書に記載される方法のさらなる利点を示す。

【0612】

実施例13：増大されたCD8+ T細胞の収量および表現型 - 可溶性試薬のサイズ変動および刺激のための α CD8-Fab添加物の添加

本実施例では、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した精製CD8+ Tレスポンダー細胞の増大を調べた。加えて、CD8+ T細胞に関する増大の特異性を高めるために α CD8-Fabを試薬に添加する効果を調べた。

【0613】

この目的のために、300,000個の精製CD8+レスポンダーT細胞 (Tresp)を、2つの異なるStreptactinベースの試薬、すなわち実施例8の小さな多量体化作用物質 (1mg/ml) または上記のより大きな多量体化作用物質 (0.1mg/ml) のいずれかで別々に刺激した。両方のオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬骨格3 μ lに、上記の0.5 μ g α CD3 Fab断片と0.5 μ g α CD28 Fab断片との組み合わせを負荷して、多量体化作用物質を形成した。加えて、4.5 μ lのより小さなオリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格に、上記の0.5 μ g α CD3 Fab断片、0.5 μ g α CD8 Fab断片、および0.5 μ g α CD28 Fab断片を負荷した。さらに、0.5 μ g α CD3 Fab断片のみまたは0.5 μ g α CD28 Fab断片のみで単に機能化された「より小さな」オリゴマーストレプトアビジンムテイン骨格3 μ lを使用した。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズで刺激したTrespを陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種した。3日目に培地交換しつつ細胞を37℃でインキュベートし、6日後に解析した。図17Aは、陰性対照と比較し、かつ陽性対照に対して正規化した、6日目に収集された細胞の数に従った増殖の程度を示す。図17Aは、多量体化作用物質を用いるCD8+ T細胞の増大が、抗CD3／抗CD28ビーズを用いる増大よりも高収量のCD8+ T細胞をもたらすことを示す。細胞培養後の

CD8表面発現およびCD45RO表面発現のFACS解析（図17B）により、多量体化作用物質または抗CD3／抗CD28ビーズのいずれによっても、同じ表現型のCD8+ T細胞が増大されたことが示される（一元配置ANOVAを用いて様々な刺激条件を比較したところ、有意差（n.s.）は検出されなかった）。抗CD3／抗CD28ビーズと比較した、本明細書において開示される増大方法を用いたCD8+細胞の収量の改善は、可溶性多量体化作用物質が、抗CD3／抗CD28ビーズ上に固定化された抗体よりも、細胞表面上のそれらの標的受容体により良くアクセスできるという事実に起因する可能性がある。この改善された収量は、希少な細胞集団を初期試料から増大する場合に、非常に有利になり得る。

【0614】

加えて、0.5 µg α CD3 Fab断片および0.5 µg α CD28 Fab断片の両方が一緒に固定化された試薬を用いて得られた増大の収量（図17Bにおいて左から2番目の列）を、α CD3 Fab断片のみまたはα CD28 Fab断片のみで単に機能化された2つの試薬を用いた収量（図17Bにおいて左から3番目の列）と比較したところ、両実験が同じ増大効率を有したことがわかる。したがって、これらの実験から、第1作用物質および第2作用物質の両方が一緒に固定化された1つの試薬を使用することは、第1作用物質のみおよび第2作用物質のみがそれぞれ負荷された2つの別個の試薬を増大のために使用することと、機能的に等価であることが示される。

【0615】

実施例14：増大されたCD8+ T細胞の収量および表現型 - 様々な比率の α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片が固定化された別個の可溶性試薬の力価測定

本実施例では、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に異なる量で可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激して増大されたCD8+ Tレスポンダー細胞（Tresp）の収量および表現型を調べた。

【0616】

この目的のために、300,000個のCD8+レスポンダーT細胞（Tresp）を、様々な量の、α CD3 Fabのみおよびα CD28 Fabのみで機能化された「小さな」オリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物（1mg/ml）の混合物（「1x」は、0.5 µg α CD3のみで機能化された1.5 µgオリゴマーストレプトアビジンムテインおよび0.5 µg α CD28 Fab断片のみで機能化された1.5 µgオリゴマーストレプトアビジンムテインに相当する）、または0.5 µg α CD3 Fabおよび0.5 µg α CD28 Fabが負荷されたオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物3 µl、または0.5 µg α CD3 Fab、0.5 µg strep-tag付加 α CD8 Fab、および0.5 µg α CD28 Fabが負荷されたオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物4.5 µlで刺激した。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズで刺激したTrespを陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種した。細胞を、培地交換せずに37℃でインキュベートし、5日後に解析した。図18Aは、陰性対照と比較し、かつ陽性対照に対して正規化した、5日目に収集された細胞の数に従った増殖の程度を示す。図18Aは、様々な多量体化作用物質を用いるCD8+ T細胞の増大が、抗CD3／抗CD28ビーズを用いる増大よりも高収量のCD8+ T細胞をもたらすことを示す（特に、5x条件の累計試薬量によって、特に経時的に細胞の最適な増大が生じ／細胞分裂を開始させることにより合計細胞が増加した）。細胞培養後のCD8表面発現およびCD45RO（図18B）表面発現のFACS解析により、多量体化作用物質または市販の抗CD3／抗CD28ビーズのいずれによっても、同じ表現型のCD8+ T細胞が増大されたことが示される。

【0617】

実施例15：刺激のために α CD8-Fabを添加して増大されたCD3+ T細胞の収量およびサブセット組成

本実験は、可溶性試薬として機能する実施例8の可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に可逆的に固定化された α CD3/ α CD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した精製CD3+ Tレスポンダー細胞の増大を示す。1つの実験では、可逆的 α CD3/ α CD28多量体化作用物質でインビトロにおいて特定のT細胞亜集団を優先的に刺激することが可能であるかどうかを試験するために、α CD3/ α CD28 Fab断片に加えて、IBA GmbH, Gottingen, G

10

20

30

40

50

ermanyから市販されている α CD8 Fab断片（カタログ番号6-8000-203）を可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に固定化した。より詳細には、500,000個の精製CD3+レスポンダーT細胞（Tresp）を、0.5 μ gの α CD3 Fabと0.5 μ gの α CD28 Fabとの組み合わせが負荷されたオリゴマーストレプトアビジンムテインの調製物（1mg/ml）3 μ lで刺激した。代替アプローチとして、4.5 μ lのオリゴマーストレプトアビジンムテインに0.5 μ g α CD3 Fab、0.5 μ g strep-tag付加 α CD8 Fab、および0.5 μ g strep-tag付加 α CD28 Fabを負荷した。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3/抗CD28ビーズ（ α CD3モノクローナル抗体および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されているビーズ）で刺激したTrespを陽性対照とした。図19Aからわかるように、 α CD3 Fab断片、 α CD28 Fab断片、およびまた α CD8 Fab断片が可逆的に負荷された試薬は、最大数の増大されたCD3+ T細胞をもたらしした。増大された細胞の数はおよそ 1×10^6 個であり、収量は、市販の抗CD3/抗CD28ビーズを用いるこれらのT細胞の増大よりも約30%高かった。加えて、およびより重要なことには、図19Bに示されるように、 α CD3 Fab断片、 α CD28 Fab断片、および α CD8 Fab断片を有するこの試薬を用いた場合、抗CD3/抗CD28ビーズ、または本明細書に記載されるような第1作用物質および第2作用物質として α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片のみを有する可溶性試薬を用いた増大の両方と比較して、CD8+ T細胞の量が最も多かった。したがって、本実験もまた、所望の細胞集団に一次活性化シグナルを提供する第1作用物質、および任意で共刺激シグナルを提供する第2作用物質に加えて、所望の細胞集団の活性化に特異的なさらなる作用物質を試薬上に固定化することができるという、本明細書に記載される組成物および方法の利点を示す。したがって、そのようにすることによって、本明細書に記載される組成物および方法は、例えば種々の異なる亜集団を含む試料から任意の所望の細胞集団または細胞亜集団を優先的に増大するまたは選択的に濃縮する可能性を提供する。

【0618】

実施例16：Jurkat細胞における差次的細胞内カルシウム動員の解析

ここでは、 α CD3抗体クローンOKT3またはStrep-tactin（登録商標）で多量体化されたOKT3のFab断片のいずれかで標識されたJurkat細胞において誘導された差次的細胞内カルシウム動員のリアルタイムフローサイトメトリー（low-cytometric）解析について調べた。

【0619】

この目的のために、Jurkat細胞にカルシウム感受性色素Indo-1-AMを負荷し、 α CD3モノクローナル抗体OKT3（ハイブリドーマ細胞株OKT3によって産生、上記を参照されたい、黒四角）、またはフィコエリトリンと蛍光的にコンジュゲートされた可溶性Strep-Tactinにそのストレプトアビジン結合ペプチドを可逆的に結合させることによって多量体化された α CD3 Fab断片（親細胞株OKT3に由来）のいずれかを注入することによって、カルシウム放出を誘発した。インタクトな多量体OKT3 Fab-Strep-Tactin複合体の場合、親抗体クローンと同一期間にわたってカルシウム放出が誘発された（濃い灰色の三角形）。細胞の活性化は、PBS陰性対照（白色の倒立三角形）の注入と同じく、D-ビオチンで処理し、予め解離させたFab-Strep-Tactin複合体（薄い灰色の丸）の注入によって、完全に回避され得た。イオノマイシンの適用を、カルシウム流入の陽性対照とした。細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間分解変化を、FL6/FL7比率の変化に基づいてフローサイトメトリーによってモニターした。図20Aから、親抗体OKT3およびOKT3の多量体化一価Fab断片の両方がカルシウム放出をもたらしことがわかり、このことはOKT3の多量体化一価Fab断片が本質的に親抗体と同様に機能的であることを意味する。注目すべきことには、Streptactin-OKT3 Fab断片を添加する前に、OKT3 Fab断片が固定化されたStrep-tactinにビオチンを添加した場合、多量体OKT3 Fab断片はカルシウム放出を誘発することができなかった。この場合、ビオチンは、多量体形成物質としてのStrep-tactinとOKT3 Fab断片との間に形成された可逆的結合を破壊した。したがって、一価Fab断片は多量体形成物質から外され、解離後には、Jurkat細胞のCD3に結合することによってカルシウム放出を誘発することができなかった。

【0620】

図20Bに示される実験では、indo-1-AMで標識されたJurkat細胞を、図20Aに記載される

10

20

30

40

50

ように、OKT3由来の α CD3 Fab-Strep-Tactin複合体によって活性化した。インタクトな（上のグラフ）または予め解離させた複合体（下のグラフ）の注入を、それぞれ陽性対照または陰性対照とした。加えて、インタクトなFab-Strep Tactin複合体で細胞を刺激し、続いて（活性化ピーク付近の $t=140s$ において）D-ビオチンを注入したところ、 α CD3 Fab多量体シグナル伝達が急激に崩壊した（中央のグラフ）。予め解離させたFab複合体群へのイオノマイシンの注入を陽性対照とした。データは、3つの異なる実験の代表である。重要なことには、図20Bは、D-ビオチンを試料に添加することによって、Strep-tactin多量体形成物質からFab断片が速やかに外され、それによってカルシウム刺激の継続中であってもカルシウム放出が効率的に終了することを示し、解離したOKT3 Fab断片がもはや生物学的活性を持たないことを実証する。同様に、多量体OKT3 Fab断片は、Streptactin-OKT3 Fab試料をJurkat細胞に添加する前にStrep-tactin-OKT3 Fab断片多量体にビオチンを添加した場合にも、カルシウム放出を誘発することができなかった。

10

【0621】

実施例17： α CD3 Fab多量体による細胞の可逆的染色

本実施例では、 α CD3 Fab多量体による細胞の可逆的染色について調べる。新たに単離されたPBMCを、 α CD3モノクローナル抗体クローンOKT3（左のドットプロット、Fab多量体の親クローン）または同族のフィコエリトリン（PE）標識OKT3 Fab多量体のいずれかで染色し、D-ビオチンで処理する前（左から2番目のドットプロット）または後（中央のドットプロット）に解析した。次いで、新たなPE標識Strep-Tactin（登録商標）を用いて、その後の洗浄段階後に、残存するFab単量体を検出した（右から2番目のドットプロット）。可逆的に染色された細胞の二次Fab多量体染色を陽性対照とした（右のドットプロット）。生／死を判別するためのヨウ化プロピジウム（PI）による染色において陰性である生存CD3細胞のみを図21に示す。ドットプロット中の数字は、ゲート内の細胞のパーセンテージを示す。本実験により、多量体形成試薬としてのStreptactinで多量体化された抗CD3 Fab断片によるCD3⁺ PBMCの染色が、D-ビオチンの添加によって完全に可逆的であること、および一価Fab断片のみではPBMC上に存在するCD3分子に結合しないことが示される。

20

【0622】

実施例18： α CD28 Fab多量体による細胞の可逆的単離

本実施例は、Strep-Tactin（登録商標）磁気粒子（この磁気粒子は、IBA GmbH Gottingen, Germanyから入手可能である）で多量体化された抗CD28 Fab断片の可逆的結合による細胞の単離を示す。上記の実施例7に記載される抗体CD28.3に由来するFab断片をこの目的のために使用した。本質的に国際特許出願公開W02013/011011に記載されているように、新たに単離されたPBMCからFab多量体磁気細胞選択によってCD28⁺細胞を選択／単離した。結果を図22に示す。選択の前に、対照選択としての同族蛍光 α CD28多量体（左のドットプロット）または免疫グロブリンカップ軽鎖に対する抗体（左から2番目のドットプロット、 α -IgカッパmAb）のいずれかで、細胞を対照染色した。選択後、CD28⁺細胞をD-ビオチンで処理し、次に洗浄して磁気ビーズおよびFab単量体を除去した。次に、遊離したCD28⁺細胞を α CD28 Fab多量体（右から2番目のドットプロット）または α -IgカッパmAb（右のドットプロット）のいずれかで（再）染色して、残存している可能性のあるFab単量体を検出した。生存（PI^{陰性}）CD3⁺細胞のみを示す。ドットプロット中の数字は、ゲート内の細胞のパーセンテージを示す。図22は、CD28⁺細胞が、このような多量体化抗CD28 Fab断片を用いてPBMCから単離され得ること、および抗CD28 Fab単量体を含む単離試薬がすべて、選択後に除去され得ることを示す。

30

40

【0623】

実施例19：可逆的 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer多量体でインビトロにおいて刺激した精製CD4⁺ Tレスポンドー細胞およびCD8⁺ Tレスポンドー細胞の活性化後の早期クラスター形成

本実施例では、400,000個のCD4⁺レスポンドーT細胞またはCD8⁺レスポンドーT細胞（Tresp）を、0.5 μ g α CD3 Fabと0.5 μ g α CD28 Fabとの組み合わせが負荷されたオリゴマースtreptactin多量体形成試薬の調製物（1mg/ml）3 μ lで刺激した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズで刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tre

50

sp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種した。細胞を37℃でインキュベートし、1日および2日後に顕微鏡で解析した。CD4+ Tresp（図23A）およびCD8+ Tresp（図23B）の刺激を、それぞれ抗CD3／抗CD28ビーズ（中央の列）および多量体化作用物質（下の列）について示す。写真は、クラスター形成の程度を表す：見やすくするために、図23Aおよび図23Bでは、可溶性ストレプトアビジンオリゴマーによる刺激について、例示的なクラスターを丸で示す。Dynabead刺激におけるクラスターは、濃い色の刺激粒子の蓄積によって容易に視認される。明らかであるように、可溶性オリゴマー多量体形成試薬を使用する本発明の増大方法を用いた場合に、CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞の両方について、早期にクラスターが形成された。

【0624】

10

実施例20：バルクCD3+セントラルメモリーT細胞からのT_{CM}レスポnder細胞の選択的抗原特異的増大（動態および表現型）

本実施例では、精製CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}レスポnder細胞からの選択的抗原特異的（Ag特異的）増大の動態および表現型を調べた。

【0625】

より詳細には、CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}レスポnder細胞を、ペプチド：MHC分子複合体（細胞に一次活性化シグナルを提供する第1作用物質として作用）およびαCD28 Fab断片（細胞の表面上のアクセサリー分子を刺激する第2試薬として作用）の両方でインビトロにおいて刺激した。抗原特異的ペプチドとMHC分子との複合体およびαCD28 Fab断片はいずれも、実施例8に記載される可溶性オリゴマーストレプトアビジン（n≥3）上に可逆的に固定化した。抗原特異的増大のために使用されたペプチドは、サイトメガロウイルス（CMV）に特異的であるHLA-C7/IE-1エピトープを表す前初期1タンパク質（Ameres et al, PLOS Pathogens, May 2013, vol. 9, issue 5, e1003383に記載）のアミノ酸309～317であるペプチドCRVLCCYVL（SEQ ID NO: 38）であった。このペプチドを提示するMHC I分子は、α鎖（重鎖）のC末端において、ストレプトアビジン結合ペプチド（IBA GmbH, Göttingen, Germanyから「Twin-Strep-tag（登録商標）」として市販されている）SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK, (SEQ ID NO: 16)

20

を有する。

【0626】

この目的のために、500,000個のCD3+CD62L+CD45RA-レスポnderT_{CM}細胞（Tresp）を、ストレプトアビジン結合ペプチドを備えた0.5μgのペプチド：MHCクラスI複合体および0.5μgの上記αCD28 Fabで機能化された可溶性オリゴマーStreptactin多量体形成試薬の調製物3μlを用いてAg特異的に刺激した。代替法として、Streptactin多量体形成試薬の調製物4.5μlに、0.5μgのこれらペプチド：MHCクラスI複合体、0.5μg CD8 αFab、および0.5μg αCD28 Fabを負荷した。比較のために、0.5μg αCD3 Fabと0.5μg αCD28 Fabとの組み合わせが負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物（1mg/ml）3μlを用いて、ポリクローナル刺激を実施した。さらに上記の代替の刺激条件として、0.5μg αCD3 Fab、0.5μg αCD8 Fab、および0.5μg αCD28 Fabが可逆的に負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物4.5μlを使用した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（αCD3モノクローナル抗体およびαCD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されたビーズ）でポリクローナル刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2および5ng/ml IL-15を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種した。3日ごとに培地交換しながら細胞を37℃でインキュベートし、7日および14日後に細胞数を解析した。例示的な結果を、図24（A～F）に示す。（CMVの）HLA-C7/IE-1エピトープのためのペプチド：MHC-I複合体が固定化された可溶性strept-tactinオリゴマーを介して刺激／増大されたAg特異的細胞の画分についての例示的なフローサイトメトリ解析（図24A）により、これらの抗原特異的T細胞が特異的に増大されたことが示される。図24B～図24Eのグラフ（図24Aに示される増大実験と同様に、時点ごとに収集されたペプチド：MHCI多量体陽性細胞の数に従って、異なるAg特異性の増大の程度を表す）は、Ag特異的ペプチドおよびMHC I分子の各複合体を使用する多量体形成試薬が最大数の増大細

30

40

50

胞を提供することを示し（HLA-A2402によって拘束されるCMVのpp65エピトープ（アミノ酸341～350

(QYDPVAAALF, (SEQ ID NO: 39)

）を認識するAg特異的細胞の細胞数の20倍増加（図24Bを参照されたい）から、CMVのHLA-B7/IE-1_{309～317}エピトープ

(CRVLCCYVL (SEQ ID NO: 38)

を認識するAg特異的細胞の数の98倍増加（図24Eを参照されたい）に及ぶ）、それによって本発明の増大方法がAg特異的細胞の増大に十分に適用可能であることを示す。最後に、図24Fに示される、（アデノウイルスの）HLA-B7/ヘキソン5エピトープに関する14日間の培養後のCD62LおよびCD127の表面発現の例示的なフローサイトメトリー解析から、本発明の可溶性多量体形成試薬を用いる実験アプローチが、ポリクローナルのおよびAg特異的な刺激条件において、より高い含有量のCD127発現長寿命メモリーT細胞を保持することがさらに確認される。

10

【0627】

実施例21：バルクセントラルメモリーT細胞の選択的Ag特異的増大の動態および表現型

本実施例では、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン上に第1作用物質および第2作用物質として可逆的に固定化された(a) 抗原特異的ペプチドMHC I複合体および(b) αCD28 Fab断片でインビトロにおいて刺激した精製CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}レスポンドー細胞からの選択的Ag特異的増大の動態について調べる。

【0628】

20

この目的のために、500,000個のCD3+CD62L+CD45RA-レスポンドーT_{CM}細胞（Tresp）を、ストレプトアビジン結合ペプチドを備えた0.5 μgのペプチド：MHCクラスI複合体（特異的ペプチドは、HLA-B07によって拘束されるアデノウイルスのヘキソン5タンパク質のアミノ酸114～124

(CPYSGTAYNSL, SEQ ID NO: 41)

を表す）および0.5 μg αCD28 Fabで機能化されたStreptactin多量体形成試薬の調製物3 μlを用いてAg特異的に刺激した。代替法として、Streptactin多量体形成試薬の調製物4.5 μlに、0.5 μgのこのペプチド：MHCクラスI複合体、0.5 μg αCD8 Fab、および0.5 μg αCD28 Fabを負荷した。比較のために、0.5 μg αCD3 Fabと0.5 μg αCD28 Fabとの組み合わせが負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物（1mg/ml）3 μlを用いて、ポリクローナル刺激を実施した。さらに上記の代替の刺激条件として、0.5 μg αCD3 Fab、0.5 μg αCD8 Fab、および0.5 μg αCD28 Fabが負荷されたStreptactin多量体の調製物4.5 μlを使用した。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズでポリクローナル刺激したTresp細胞を陽性対照とした。Tresp細胞を、30U/ml IL-2および5 ng/ml IL-15を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種した。3日ごとに培地交換しながら細胞を37℃でインキュベートし、7日および14日後に細胞数を解析した。図25に示される写真は5日目のクラスター形成の程度を表し、例示的なAg特異的刺激がアデノウイルスのHLA-B7/ヘキソン5エピトープについて示される。図25からわかるように、元のCD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}レスポンドー集団から、このようなアデノウイルス抗原特異的細胞を特異的に増大することができた。

30

40

【0629】

実施例22：aCD19-CARが形質導入されたJurkat細胞のStreptamer多量体による刺激後の細胞内シグナル伝達カスケードの活性化

本実施例では、腫瘍特異的キメラ抗原受容体（CAR）、すなわちこの場合CD19を発現するように改変されており、かつ可溶性多量体形成試薬として実施例8のオリゴマー-Streptactin（登録商標）を用いて刺激した形質導入Jurkat細胞の細胞内シグナル伝達カスケードの活性化を調べた。

【0630】

この目的のために、300,000個のJurkatレスポンドー細胞（Jresp）を、(A) 様々な量の、本明細書に記載されるαCD3 Fab断片およびαCD28 Fab断片で機能化されたStreptactin

50

多量体形成試薬の調製物 (1mg/ml) の混合物 (「x1」は、0.5 μ g α CD3 Fabおよび0.5 μ g α CD28 Fabで機能化された3 μ g Streptactin多量体形成試薬に相当する - これは「ポリクロナルなStreptactinベースの多量体形成試薬」を提供する)、あるいは (B) 0.5 μ g (x1) もしくは1 μ g (x2) のCD19の細胞外ドメイン (ECD) で機能化されたStreptactin多量体形成試薬の調製物3 μ l (α CD19-CARの天然リガンド - これは「CAR特異的なStreptactinベースの可溶性多量体形成試薬」を提供する)、または α CD19-CAR内のIgG4スパーサーを認識する0.5 μ g (x1) もしくは1 μ g (x2) の α IgGが負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物3 μ l (これもまた「CAR特異的なストレプトアビジンベースの多量体形成試薬」を提供する) で刺激した。ヘキサヒスチジンタグを備えたCD19のECDは、Sino Biological/Life technologiesから入手し (SEQ ID NO: 47)、CD19のECDとアダプター分子His-STREPPER (IBA GmbH, Germany、注文番号2-0920-005) を1:1の分子比で混合し、室温で15分間インキュベートすることによって、ストレプトアビジンベースの多量体形成試薬に結合させるために機能化した。His-STREPPERアダプター分子は、ヘキサヒスチジンタグに結合するキレート部分およびストレプトアビジン結合ペプチドを含有し、それによって標的分子、この場合CD19のECDに、ストレプトアビジンベースの多量体形成試薬に可逆的に結合し得るストレプトアビジン結合ペプチドを一時的に提供する。抗CD3/抗CD28ビーズ (α CD3モノクローナル抗体および α CD28モノクローナル抗体が不可逆的に固定化されているビーズ) またはPMAおよびイオノマイシンで刺激したJrespを、陽性対照とした。Jresp細胞を、30U/mL IL-2を補充した細胞培養液200 μ l中、1.5mL Eppendorfチューブに播種した。細胞を37°Cでインキュベートし、0分~20分間刺激した後、氷上に置き、溶解させた。リン酸化ERKの検出は、活性MAPKのシグナル伝達を示し、ハウスキーパー β -アクチンの染色は、条件および時間当たり等量の総タンパク質量が負荷されたことを示す。「ポリクロナルStreptactin多量体形成試薬」を介したJurkat細胞の活性化を示す図26Aと2つの「CAR特異的なStreptactinベースの多量体形成試薬」を介したJurkat細胞の活性化を示す図26Bとの比較からわかるように、Jurkat細胞は、CD19特異的なキメラ抗原受容体に対するCD19細胞外ドメインの結合を介して活性化/増大され得る。T細胞の遺伝的下流プロセッシングは、ほとんど、予め選択された細胞集団に対してのみ行われるため、IgG4スパーサードメイン (これは、異なる特異性を有する様々なCAR内で保存されている) を介した、導入されたCARの架橋を介した包括的な活性化は、これらのインビトロ細胞プロセッシング状況における可逆的な細胞刺激/増大への適用性を広げる。

【0631】

したがって、本実験により、原則として、細胞集団に一次活性化シグナルを提供する作用物質 (リガンド) の結合によって活性化される任意の細胞集団を、本明細書に記載されるように多量体形成試薬上に可逆的に固定化された第1作用物質を用いて増大することができるが示される。

【0632】

実施例23: 単一プールからのT_{CM}レスポンドー細胞の並列抗原特異的な増大

本実施例では、複数の可逆的なペプチド:MHC/ α CH28 Fab-Streptamer多量体でインビトロにおいて刺激したTレスポンドー細胞の単一プールからの並列抗原特異的な (Ag特異的な) 増大の動態を調べる。

【0633】

500,000個のCD3+CD62L+CD45RA-レスポンドーT_{CM}細胞 (Tresp) を、各特異性について、ストレプトアビジン結合ペプチドを有する0.5 μ gの各ペプチド:MHCクラスI複合体および同様にストレプトアビジン結合ペプチドを有する0.5 μ g α CD28 Fabで機能化されたStreptactin多量体3 μ lを用いて、複数のAg特異性について同時に刺激する。代替アプローチとして、各特異性について、本明細書に記載される、ストレプトアビジン結合ペプチドを有する0.5 μ gペプチド:MHCクラスI複合体、0.5 μ g α CD8 Fab、および0.5 μ g α CD28 Fabで機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬4.5 μ lを使用する。比較のために、0.5 μ g α CD3 Fabと0.5 μ g α CD28 Fabとの組み合わせが可逆的に負荷されたStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物 (1mg/ml) 3 μ lを用いて、ポリクロナル刺激を実施す

る。さらに上記の代替の刺激条件として、0.5 μ g α CD3 Fab、0.5 μ g α CD8 Fab、および0.5 μ g α CD28 Fab（それらの各々がストレプトアビジン結合ペプチドを有する）が可逆的に負荷されたStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物4.5 μ lを使用することができる。未処理（非刺激）のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3 mAbおよび α CD28 mAbでコーティングされたビーズ）でポリクロナル刺激したTresp細胞を陽性対照とする。Tresp細胞を、30U/ml IL-2および5ng/ml IL-15を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種する。3日ごとに培地交換しながら細胞を37℃でインキュベートし、7日および14日後に細胞数を解析する。

【0634】

実施例24： α CD3/ α CD8/ α CD28 Fab断片で可逆的に機能化されたストレプトアビジンベースの多量体形成試薬でインビトロにおいて刺激したCD3+ Tレスポonder細胞のうちのCD8+ T細胞の優先的増殖

10

300,000個のCD3+レスポonderT細胞（Tresp）を、0.5 μ g α CD3 Fabと0.5 μ g α CD28 Fabとの組み合わせが負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物（1mg/ml）3 μ lもしくは大きなStreptactin骨格を用いる多量体形成試薬の調製物（0.1mg/ml）3 μ l、または0.5 μ g α CD3 Fab、0.5 μ g α CD8 Fab、および0.5 μ g α CD28 Fabが負荷されたStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物4.5 μ l、または0.5 μ g α CD3 Fabのみおよび0.5 μ g α CD28 Fabのみ（各Fab断片は同様にストレプトアビジン結合ペプチドを有する）を有するStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物の混合物3 μ lで刺激する。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3 mAbおよび α CD28 mAbでコーティングされたビーズ）で刺激したTrespを陽性対照とする。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに2つ組で播種する。細胞を37℃でインキュベートし、3日後に培地交換し、6日後に解析する。

20

【0635】

実施例25： α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片で可逆的に機能化されたストレプトアビジンベースの多量体形成試薬でインビトロにおいて刺激したCD3+ Tレスポonder細胞のうちのCD8+ T細胞の優先的増殖

300,000個のCD3+レスポonderT細胞（Tresp）を、様々な量の、 α CD3 Fab断片のみおよび α CD28 Fab断片のみで機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物（1mg/ml）の混合物（0.5 μ g α CD3 Fab断片のみで機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬1.5 μ g、および0.5 μ g α CD28 Fab断片のみで機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬1.5 μ g）、または様々な量の、 α CD8 Fab断片を伴ってもしくは伴わずに α CD3 Fab断片および α CD28 Fab断片で機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬の調製物の混合物（各Fab断片はここでもストレプトアビジン結合ペプチドを有する）（ α CD8 Fab断片を伴わずに0.5 μ g α CD3 Fab断片および0.5 μ g α CD28 Fab断片で機能化されたStreptactinベースの多量体形成試薬3 μ g、または0.5 μ g α CD3 Fab断片、0.5 μ g α CD8 Fab断片、および0.5 μ g α CD28 Fab断片が負荷されたStreptactin多量体形成試薬の調製物4.5 μ l、この場合Fab断片は同様にストレプトアビジン結合ペプチドを有する）で刺激する。未処理のTresp細胞を陰性対照とし、抗CD3／抗CD28ビーズ（ α CD3 mAbおよび α CD28 mAbでコーティングされたビーズ）で刺激したTrespを陽性対照とする。Tresp細胞を、30U/ml IL-2を補充した細胞培養液1ml中、48ウェルプレートに播種する。細胞を37℃でインキュベートし、3日後に培地交換し、6日後に解析する。

30

40

【0636】

実施例26：初代T細胞における細胞内カルシウム動員の解析による、刺激のバイオチン媒介性妨害

初代ヒトT細胞の刺激に対する、（D-バイオチン添加により）可逆的多量体化試薬を介した細胞刺激を妨害する影響を、Ca²⁺流動を評価することによってモニターした。健常ドナーの末梢血単核細胞（PBMC）からCD3精製されたT細胞に、カルシウムセンサー色素をロードし、オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬上に可逆的に結合している多量体化抗CD3／抗CD28 Fab断片を含有する試薬とインキュベートして、フローサイトメトリー解析

50

によってCa²⁺流動について評価した。抗CD3／抗CD28多量体化作用物質を、60秒で添加し、培養物を、邪魔せずに放置したか、または200秒で、D-ビオチン添加で処理した。T細胞のカルシウム流動の誘導が、多量体形成試薬からのFab断片の解離によってシグナルを妨害した後でも依然として可能であったことを確認するために、イオノマイシンを400秒で添加した。

【0637】

図27に示されるように、D-ビオチンの添加による解離は、試薬により誘導されたCa²⁺レベルの増加の後の、細胞内Ca²⁺レベルの減少によって示されたように、抗CD3／抗CD28多量体化作用物質を介して細胞に送達されたシグナルを妨害することができた。シグナル伝達のD-ビオチン媒介性妨害の後のイオノマイシンの添加は、細胞内Ca²⁺を、D-ビオチンの添加の前に観察されたレベルに回復し、細胞が、試薬解離の解離およびシグナル伝達の妨害後に、応答性かつ健常のままであり、カルシウムを流動することができ、イオノマイシンに応答して、最初の刺激後に観察されたものと比較した際に類似したレベルであった細胞内レベルを呈したことが示された。

【0638】

実施例27：可逆的物質とのインキュベーションによるT細胞の時間的に制御された活性化後の、T細胞増大の評価

抗CD3／抗CD28シグナルとのインキュベーション、およびその解離後に、健常ドナーPBM Cから単離されたT細胞の増大を評価した。T細胞を、オリゴマースト্রেプトアビジンムテイン試薬に可逆的に結合している多量体化抗CD3／抗CD28 Fab断片を含有する試薬の添加後に、7日間インキュベートした。培養の1日目に、多量体化作用物質を解離するためにD-ビオチンを添加したか、または、細胞を邪魔せずに放置した（1日目のD-ビオチン添加なし）。対照として、細胞を、抗CD3／抗CD28磁気ビーズと7日間インキュベートした。総細胞数およびアネキシンV陽性細胞の画分を、培養の0、3、または7日目に評価した。図28Aおよび28Bに示されるように、1日目に解離させた（ビオチンを1日目に添加した）抗CD3／抗CD28多量体化作用物質と培養したCD3⁺ T細胞は、細胞を完全に7日間、（D-ビオチン添加を伴わずに）多量体化作用物質とインキュベートした培養物、および細胞を対照の抗CD3／抗CD28ビーズとインキュベートした培養物の両方と比較して、増強された増大および（減少したアネキシンV染色によって示されるような）低減したアポトーシスを示した。

【0639】

別のアッセイにおいて、単離されたCD3⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、またはCD8⁺ T細胞を、CFSE色素で標識して、増殖を、2日目にビオチンの添加を伴ったことを除いて、上記のように刺激後に評価した。増殖は、CFSE色素の希釈の程度に基づいて、フローサイトメトリーによって決定した。図29に示されるように、1日目の解離（ビオチン添加）を伴い、抗CD3／抗CD28多量体化作用物質で刺激されたCD3⁺細胞は、多量体化作用物質で刺激されたがシグナルの妨害を伴わなかった（ビオチンなし）細胞と比較した際に、特に3日目に、増強された増殖を提示した。

【0640】

実施例28：可逆的物質とのインキュベーションによる時間的に制御された活性化後の、T細胞における代謝活性の評価

細胞増殖の指標としての細胞の代謝活性を、安定なテトラゾリウム塩WST-1の可溶性ホルマザン色素複合体への切断の比色モニタリングによって評価した。この作用物質の切断は、概して、生細胞におけるNAD(P)Hの糖分解産生に依存するため、ホルマザン色素の程度は、概して、培養物における代謝的に活性な細胞の数に直接的に相関することができる。本研究において、CD4精製されたT細胞またはCD8精製されたT細胞を、オリゴマースト্রেプトアビジンムテイン試薬上に可逆的に結合している抗CD3／抗CD28多量体化Fab断片（2日目のD-ビオチン添加を伴うかまたは伴わない）、または対照の抗CD3／抗CD28磁気ビーズ試薬とインキュベートした。細胞の培養後の1日目、2日目、または3日目に、細胞をWST-1試薬とインキュベートし、450 nmでの吸光度を読み取り値として測定することにより、代謝活性のレベルを評価した。結果を、アッセイされ、細胞数あたりのWST-1の比率とし

て示されている、培養物中の細胞の数に対して正規化した。

【0641】

図30に示されるように、結果により、抗CD3／抗CD28多量体試薬でのT細胞の制御された刺激が、試薬を解離してシグナル伝達を妨害するためにビオチンを2日目に添加した場合でさえも、本研究におけるインキュベーションの経過にわたって、代謝活性および細胞増大を示すシグナルのレベルの増加を結果としてもたらしたことが示された。

【0642】

実施例29：再刺激時のT細胞の増大能力に対する、抗CD3／抗CD28多量体物質を介したシグナル伝達の妨害の影響

CFSE色素で標識されたCD3+細胞を、ストレプトアビジンムテインのオリゴマー形態上に可逆的に結合している、多量体化抗CD3／抗CD28 Fab断片を含有する可逆的試薬の存在下で培養した。1日目に、D-ビオチンを、図31に示されるようにいくつかの試料に添加した。示されたようないくつかの条件下で、細胞を、3日目に、CFSE^{low}（非分裂）細胞について選別した。選別された細胞を、刺激のさらなる添加なしで培養した（選別精製（図31を参照されたい））か、または追加的な抗CD3／抗CD28多量体化作用物質とさらに混合した（選別精製、再刺激（図31を参照されたい））。選別されていない細胞（3日目にCFSEレベルに基づいて選別されなかった細胞）もまた、並行して評価した。無刺激の細胞に対して正規化された細胞の増大を、15日目までモニターした。

【0643】

図31に示されるように、多量体試薬とインキュベートされた細胞は、試験された条件のすべてについて15日目まで、研究の持続期間を通して増大し続けたことが観察された。多量体物質によって誘導されたシグナル伝達が1日目に妨害された試料においてさえも、細胞が試薬のさらなる添加を伴わずに選別精製されたものは、この期間にわたって増殖し続けた。この結果により、オリゴマー刺激試薬とのインキュベーションは、たとえ1日間のみであっても、15日の期間にわたって延長されたT細胞増大を誘導できたことが示された。この効果は、まだ分裂していない細胞を単離するために細胞が3日目に選別精製され、それまたは任意の刺激試薬の再添加によるさらなる刺激がなかった試料においてさえも観察された。結果は、可逆的オリゴマー刺激物質が、試薬に対する結合の破壊後および／または非分裂細胞の精製後の数日にわたって、追加的な試薬の誘導を伴わずに、延長されたT細胞増大を誘導することができたという結論と一貫しており、細胞がビーズで刺激された条件下の本アッセイにおいて、効果は観察されなかった。

【0644】

実施例30：可逆的物質とのインキュベーションによる時間的に制御された活性化後の、T細胞表面マーカーの評価

様々なT細胞マーカーの発現を、様々なタイプのレトロウイルス媒介性形質導入を含む様々な条件に供したT細胞の、それらを、D-ビオチンの添加により誘導される1日目の解離を伴うかまたは伴わずに、可逆的に結合する抗CD3／抗CD28多量体化作用物質とインキュベートすることによる刺激後に、評価した。健常ドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）からCD3精製されたT細胞に、各々が異なるキメラ抗原受容体をコードする様々なレトロウイルスベクター粒子の1つを形質導入し、培養において増大させ、凍結し、融解した。細胞を、オリゴマーストレプトアビジンムテインに対する可逆的結合によって多量体化された、多量体化抗CD3／抗CD28 Fab断片を含有する実施例1に記載された試薬の添加後に、7日間インキュベートした。培養の1日目に、いくつかの試料において細胞から多量体化作用物質を解離させるためにD-ビオチンを添加し、他方、他のものにおいては、細胞および試薬を邪魔せずに放置した（1日目のD-ビオチンの添加なし）。他の試料において、細胞を、抗CD3／抗CD28磁気ビーズと7日間インキュベートした。数多くのT細胞活性化および／または他の表現型マーカーの各々の表面および／または細胞内発現について陽性の細胞のパーセンテージを、様々な時間に評価した。

【0645】

例えば、7日目に、細胞を、記載されたようにフローサイトメトリーによって、マーカ

10

20

30

40

50

ーKi-67およびT-betの発現についてアッセイした。本明細書に記載された他の研究におけるように、可逆的オリゴマー試薬での刺激後に、試薬を1日目にシグナル伝達を妨害するために解離させた場合、細胞は、Ki67について陽性を保持していたが、T-betの発現を低減していたことが観察された。この結果により、種々の条件下で、試薬の解離による時間的制御を、あまり分化していないかまたは幹様表現型、より長命の表現型および／またはセントラルメモリー表現型および／または幹セントラルメモリー表現型を有する細胞のアウトプット組成物を生成するために使用できることが示された。

【0646】

評価したマーカーは、CD25およびCD69を含み、マーカーCD45RA、CD45RO、CD27、CD127、およびCXCR3を、フローサイトメトリーによって3日目および7日目に評価した。結果は、図32に示され、培養期間の1日目の可逆的刺激試薬の結合の破壊が、結果として生じたアウトプット組成物において、セントラルメモリー (T_{CM}) などのあまり分化していない、および／または相対的により長命の、および／または幹様のT細胞集団、ならびに、いわゆる幹メモリーT細胞 (T_{SCM}) などのあまり分化していないメモリーT細胞上で概して観察される表現型プロファイルの特性を有するT細胞のより大きなパーセンテージを結果としてもたらしたという観察と一貫している。これらの研究は、さらに、早期の時点（4日以内）のD-ビオチンの添加によるオリゴマー試薬を用いた刺激の時間的制御が、長命メモリーT細胞などのあまり分化していない、長命のT細胞の集団に存在するものと一貫した、または類似した表現型プロファイルを有する細胞が増加している細胞組成物を結果としてもたらしたという観察と一貫していた。

【0647】

本発明は、開示される特定の態様に範囲が限定されるよう意図されておらず、特定の態様は、例えば本発明の様々な局面を説明するために提供される。記載される組成物および方法の様々な改変は、本明細書中の説明および教示から明らかとなるであろう。そのような変形は、本開示の真の範囲および精神から逸脱することなく実施することができ、本開示の範囲内に入るよう意図される。

【0648】

配列

No.	配列	説明
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAV GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSG QYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASID AAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ UniProt No. P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRY DSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQ WLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSG QYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASID AAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46- Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGRY DSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQ WLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテインストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46- Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSG QYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASID AAKKAGVNNGNPLDAVQQ	ムテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46- Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAESRYVLTGRY DSAPATDGSCTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQ WLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46- Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニイ
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	ストレプトアビジン結合ペプチド、 Strepタグ(登録商標)
8	WSHPQFEK	Strepタグ(登録商標)II
9	His-Pro-Xaa	ストレプトアビジン結合 ペプチド Xaaはグルタミン、 アスパラギン、および メチオニンより選択 される
10	His-Pro-Gln-Phe	ストレプトアビジン結合 ペプチド
11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	ストレプトアビジン結合 ペプチド Xaa ₁ はTrp、Lys、または Argであり; Xaa ₂ は任意のアミノ酸 であり; Xaa ₃ はGlyまたはGlu であり;

10

20

30

40

No.	配列	説明
		Xaa ₄ はGly, LysまたはArgであり
12	-Trp-Xaa ₁ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₂ -Xaa ₃ -	ストレプトアビジン結合ペプチド Xaa ₁ は任意のアミノ酸であり; Xaa ₂ はGlyまたはGluであり、 Xaa ₃ はGly, Lys,またはArgである
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	ストレプトアビジン結合ペプチドの連続モジュール Xaaは任意のアミノ酸であり;nは8または12のいずれかである
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	ストレプトアビジン結合ペプチドの連続モジュール nは2または3である
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
18	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA タグ
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G タグ
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV タグ
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7 エピトープ
24	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV エピトープ
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc エピトープ
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5 タグ
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTIYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Δテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 および Glu117, Gly120, Try121 (Δテイン m1-9) 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTIYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Δテインストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 および Glu117, Gly120, Try121 (Δテイン m1-9) 種: ストレプトマイセス・アビジニイ
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWLGVIVASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV	Fab断片m13B8.2の可変重鎖

10

20

30

40

No.	配列	説明
	FFKLNSLQPD DTAIYYCAKNDPGTGFAYWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQFEK	
30	AMDQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLLVHDAKTLAEGV PSRFGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYIC QAHYGNPPTFGGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGS	Fab断片m13B8.2の 可変軽鎖
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	抗CD3抗体OKT3の 可変重鎖
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3抗体OKT3の 可変軽鎖
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗CD28抗体CD28.3の 可変重鎖
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	抗CD28抗体CD28.3の 可変軽鎖
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MATタグ
36	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe	αCD16 抗体 3G8 VH

10

20

30

40

No.	配列	説明
	Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
37	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	αCD16 抗体 3G8 VL
38	CRVLCCYVL	抗原特異的ペプチド
39	QYDPVAALF	CMVのpp65エピトープ (アミノ酸341～350)
40	RPHERNGFTV	CMVのpp65エピトープ (アミノ酸265～274)
41	CPYSGTAYNSL	アデノウイルスの hexon 5エピトープ (アミノ酸114～124)
42	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Pro Pro Lys Thr His Met Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu	HLA-A*2402

10

20

30

40

No.	配列	説明
	Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
43	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	HLA-B*0702
44	Met Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Cys Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Asp Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Lys Tyr Lys Arg Gln Ala Gln Ala Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Asp Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Ser Gly Cys Asp Leu Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asp Gln Ser Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Leu Glu Ala Ala Arg Ala Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Glu Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Leu Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp	HLA-C*0702

10

20

30

40

No.	配列	説明
	Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Met Gln His Glu Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
45	Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met	β_2 ミクロglobulin
46	WREPGRMELN	フォン・ ヴィレブランド因子の コラーゲン結合 ドメイン由来の 10アミノ酸タグ
47	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSL GLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTV NVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWA KDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSODLTMAPGSTLWLSGVPDPSV SRGPLSWTHVHPKGPCKSLLSLELKDDRPARDMWVMEGLLLPRATAQ DAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKAHHHHHHHHH H	Hisタグを有する ヒトCD19 細胞外ドメイン
48	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSGMGVGVIRQPSGKGL EWLAHIWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTAT YYCAQINPAWFAYWGQGLVTVSS	α CD16 抗体 3G8 VH
49	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSEFMNWWYQQKPGQP PKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKLEIK	α CD16 抗体 3G8 VL
50	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	IL-2
51	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHIC DANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITLLNCTG QVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTC WNKILMGTKHEH	IL-7
52	QQQDRHMI RMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAF SCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGRRQKHRLTCP SCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS	IL-21
53	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRANDQYLTAALHN LDEAVKFDMGAYKSSKDDAKITVILRISKTLQYVTAQDEDQPVLLKE MPEIPKTTITGSETNLLFFWETHGKTYFTSVAHPNLFIA TKQDYWVC LAGGPPSITDFQILENQA	IL-1 α
54	APVRSNLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSFV QGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKK MEKRFVFNKIEINNKLFEESAQFPNWIYSTSAENMPVFLGGTKGGQ DITDFTMQFVSS	IL-1 β

10

20

30

40

No.	配列	説明
55	GIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE SDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	IL-15
56	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEK LTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRG	IFN γ
57	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATT FCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVHVA NPQAEGLQWLNRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFK GQGPCSTHVLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAK PWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGVYFGI IAL	TNF α
58	HKCDITLQEI IKTLSL TEQKTLCTELTVDI FAASKNTTEKETFCR AATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLA GLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	IL-4
59	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPMRLRDLRDAFSRVKTF FQMKDQLDNL LKESLLED FKG YLGCA LSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSL GENLKT LRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMS EFDIFINYIEAYMTMKIRN	IL-10
60	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQF QKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ LND LEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	IFN α 2
61	MSYDVLRYQQRSSNLACQKLLGQLPGTPQYCLEDRMNFVPEEIMQP PQFQKEDAVLI IHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIKTILVELDGO MDDLETILEEIMEEENFPRGDMTILHLKKYYLSILQYLKSKEYRSCA WTVVQVEILRNFSFLNRLTDYLRN	IFN β 1
62	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNL LRAVS NMLQKARQTLEFY PCTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT SFMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTID RVMSYLNAS	IL-12 α
63	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVL GSGKTLTIQVKEFGDAGQY TCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCWWTITISTDLTF SVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNA SISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS	IL-12 β
64	GITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNRS TSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQ EILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	IL-17
65	TPVVRKGRCS CISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEI IATLKN GVQTC LNPDSADV KELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKHQQKKV LKVRKS QRSRQKKT	CXCL9
66	VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEI IATMKK KGEKRLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP	CXCL10
67	GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGR QLCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKMRRSS	CCL19
68	SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRS QAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGK GSKGCKRTERSQTPKGP	CCL21

10

20

30

40

No.	配列	説明
69	QGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKR HRKVCGNPKSREVQRAMKLLDARNKVF AKLHHNTQTFQAGPHAVKKL SSGNSKLSSSKFSNPISSSKRNVSLISANSGL	CCL25
70	GGGS	リンカーペプチド
71	YNLDVRGARFSFPPRAGRHFYRVLQVGNVIVGAPGEGNSTGSLYQ CQSGTGHCLPVTLRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSRTC DQNTYLSGLCYLFRQNLQGPMLQGRPGFQECIKGNVDLVFLFDGSMS LQPDEFQKILDFMKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDFSDYVK RKDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAINYVATEVFREELGARPDATKVL I IITDGEATDSGNIDAAKDIIRYIIGIGKHFQTKESQETLHKFASKPA SEFVKILDTFEKLKDLFTTELQKKIYVIEGTSKQDLTSFNMELSSSGI SADLSRGHAVVGAVGAKDWAGGFLLDLKADLQDDTFIGNEPLTPEVRA GYLGYYTVTLPSRQKTSLLASGAPRYQHMGRVLLFQEPQGGGHWSQV QTIHGTQIGSYFGGELCGVDVDQDGETELLLIGAPLFYGEQRGGRVF IYQRRQLGFEEVSELQGDPGYPLGRFGEAITALTDINGDGLVDVAVG APLEEQGAUYIFNGRHGGLSPQPSQRIEGTQVLSGIQWFGRSIHGVK DLEGDGLADVAVGAESQMIVLSSRPVDMVTLMFSFAEIPVHEVEC SYSTSNKMKEGVNITICFQIKSLIPQFQGRLVANLTYTLQLDGHRT RRGLFPGGRHELRRNIAVTTSMSCDTSFHFVPCVQDLISPINVSLN FSLWEEEGTPRDQRAQCKDIPPI LRPSLHSETWEIPFEKNCGEDKKC EANLRVSFSPARSRALRLTAFASLSVELSLSNLEEDAYWVQLDLHFP PGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCEELPEESRLLSRALSCNVSSPIFKAG HSVALQMMFNTLVNSSWGDSVELHANVTCNNEDSDLEDNSATTIIP ILYPINILIQDQEDSTLYVSFTPKGPKIHQVKHMYQVRIQPSIHDHN IPTLEAVVGVPQPPSEGPITHQWSVQMEPPVPCHYEDLERLPDAAEP CLPGALFRCPVVFQRQILVQVIGTLELVGEIEASSMFLCSSLSISF NSSKHFHLYGSNASLAQVVMKVDVVYEKQMLYLYVLSGIGGLLLLLL IFIVLYKVGFFKRNLKEKMEAGRVPNGIPAEDSEQLASGQEAQDPG CLKPLHEKDSESGGKD	LFA-1 α (ホモ・サピエンス (homo sapiens))
72	QECTKFKVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTGPGDPDSIRCDTRPQLL MRGCAADDIMDPTSLAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFN VTFRRAKGYPIDLYYLMDSL SYSMLDDLNRNVKKLGGDLLRALNEITES GRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPDKLRNPCPNKEKECQPPFAFRHVLKL TNNSNQFQTEVGKQLISGNLDAPEGGLDAMQVAACPEEIGWRNVTR LLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNEFDYPSV GQLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSSN VVQLIKNAYNKLSSRVFLDHNAIPDLTKVTYDSFCSNGVTHRNQPRG DCDGVQINVPITFQVKVTATECIEQSFVIRALGFTDIVTVQVLPQC ECRCRDQSRDRSLCHGKGFLCIGICRCDTGYIGKNCECQTQGRSSQE LEGSCRKDNNIIICSGLGDCVCGQCLCHTSDVPGKLIYGQYCECDTI NCERYNGQVCGGPGRGLCFCKGCRCHPGFEGSACQCERTTEGCLNPR RVECSGRGRCRCNVCECHSGYQLPLCQECPCGCPSPCGKYISCAECLK FEKGPFGKNCSAACPGQLSNNPVKGRGTCKERDSEGCWVAYTLEQQD GMDRYLIYVDESRECVAGPNIAAIVGGTVAGIVLIGILLLVWKALI HLSDLREYRRFEKEKLKSQWNNNDNPLFKSATTITVMNPKFAES	LFA-1 β (ホモ・サピエンス)
73	DFLAHHGTDCTWYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAIQNKAEIEY LEKTLFPFSRYWIGIRKIGGIWTVGTNKSLEEAENWGDGEPNNK KNKEDCVEIYIKRNKDAGKWNDDACHKLKAALCYTASCQPWSCSGHG ECVEIINNYTCNCDVGYGPGQCQFVIQCEPLEAPELGTMDC THPLGN FSFSSQCAFSCSEGTNLTGIEETTCGPFNGWSSPEPTCQVIQCEPLS APDLGIMNC SHPLASFSTSACTFICSEGTELIGKKKTICESSGIWS NPSPICQKLDKSFMIKEGDYNPLFIPVAVMVTAFSGLAFIIWLARR	L-セレクチン (ホモ・サピエンス)

10

20

30

40

No.	配列	説明
	LKKGKSKRSMNDPY	
74	FKIETTPESRYLAQIGDSVSLTCSTTGCESPFFSWRTQIDSPLNGKV TNEGTTSTLTMPVSFGNEHSYLCTATCESRKLEKGIQVEIYSFPKD PEIHLSGPLEAGKPITVKCSVADVYPFDRLEIDLKGDHLMKSQEF EDADRKSLETKSLEVTFTPVEDIGKVLVCRAKLHIDEMDSVPTVRQ AVKELQVYISPKNTVISVNPSTKLQEGGSVTMTCSSEGLPAPEIFWS KKLDNGNLQHLSGNATLTLIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVEL IVQEKPFTEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSVMGCESPSFSWRTQIDS PLSGKVRSEGTNSTLTLSPVSFENEHSYLCTVTTCGHKKLEKGIQVEL YSFPRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCVPSVYPLDRLEIELLKGETIL ENIEFLEDTDMKSLENKSLEMTFIPTIEDTGKALVCQAKLHIDDMEF EPKQRQSTQTLVNVAPRDTTVLVSPSSILEEGSSVNMTCLSQGFP PKILWSRQLPNEGELQPLSENATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRS RKEVELIIQVTPKDIKLTAFPSSESVKEGDTVIIISCTCGNVPETWII KKKAETGDTVLSIDGAYTIRKAQLKDAGVYECESKNKVGSQRLSLT LDVQGRENNKDYFPELLVLVYFASSLIIPAIGMIIYFARKANMKGSY SLVEAQKSKV	VCAM-1 (ホモ・サピエンス)
75	YNVDTESALLYQGPHTLFCYSVVLHSHGANRWLLVGAPTANWLANA SVINPGAIYRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWL GVTLSRQPGENGSIIVTCGHRWKNIFYIKNENKLP TGCGYGVPPDLRT ELSKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGSSYW TGSFLVYNITTNYKAFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSQHTTEV VGGAPQHEQIGKAYIFSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGASVCAVDL NADGFSDDL VGAPMQSTIREEGRVFVYINSGSGAVMNAMETNLVGS KYAARFGESIVNLGDI DNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIYINGRADG ISSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSIGQIDADNNGYVDVAVGAFRSD SAVLLRTRPVVIDASLSHPESVNRTKFDCEVNGWPSVCIDLTLCS YKGEVPGYIVLFYNMSLDVNRKAESPFRFYSSNGTSDVITGSIQV SSREANCRTHQAFMRKDV RDILTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFP PLQPILQQKKEKDIMKKTINFARFCAHENC SADLQVSAKIGFLKPHE NKTYLAVGSMKTLMLNVSLFNAGDDAYETTLHVKL PVGLYFIKILEL EEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGYIYVDHLSRIDISFLLDVSSLSRA EEDLSITVHATCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLKYEVKLT VHGFVNPT SFVYGSNDENEPETCMVEKMNLTFHVINTGNSMAPNVSV EIMVPNSF SPQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQRVCALEQQKSAMQTLKGIVRF LSKTDKRLLYCIKADPHCLNFLCNFGKMESGKEASVHIQLEGRPSIL EMDETSALKFEIRATGFPEPNPRVIELNKDENVAHVLLLEGLHHQRPK RYFTTIVIISSLLLGLIVLLLISYVMWKAGFFKRQYKSILQEENRRD SWSYINSKSNDD	VLA-4 (ホモ・サピエンス)
76	YNLDVRGARSFSPPRAGRHFYRVLQVGNVIVGAPGEGNSTGSLYQ CQSGTGHCLPVTLRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSRTC DQNTYLSGLCYLFRQNLQGPMLQGRPGFQECIKGNVDLVFLFDGSM LQPDEFQKILDFMKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDFSDYVK RKDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAINYVATEVFREELGARPDATKVL IITDGEATDSGNIDAAKDIIRYIIGIGKHFQTKESQETLHKFASKPA SEFVKILDTFEKLKDLFTTELQKKIYVIEGTSKQDLTSFNMESSSGI SADLSRGHAVVGAVGAKDWAGGFLDLKADLQDDTFIGNEPLTPEVRA GYLGYVTWLP SRQKTSLLASGAPRYQHMGRLVLLFQEPQGGGHWSQV QTIHGTQIGSYFGGELCGVDVDQDGETELLIGAPLFYGEQRRGGRVF IYQRRQLGFEEVSELQGDPGYPLGRFGEAITALTDINGDGLVDVAVG APLEEQGA VYIFNGRHGGLSPQPSQRIEGTQVLSGIQWFGRSIHGVK DLEGDGLADVAVGAESQMIVLSSRPVDMVTLMSPAEIPVHEVEC	LFA-1 α 細胞外 ドメイン (ECD)

10

20

30

40

No.	配列	説明
	SYSTSNKMKEGVNITICFQIKSLIPQFQGRLVANLTYTLQLDGHRT RRGLFPGGRHELRRNIAVTTSMSCDFSFHFPVCVQDLISPINVSLN FSLWEEEGTPRDQRAQKGDIPPILRPSLHSETWEIPFEKNCGEDKKC EANLRVSFSPARSRALRLTAFASLSVELSLSNLEEDAYWVQLDLHFP PGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCEELPEESRLLSRALSCNVSSPIFKAG HSVALQMMFNTLVNSSWGDSVELHANVTCNNEDSDLLEDNSATTIIP ILYPINILIQDQEDSTLYVSFTPKGPKIHQVKHMYQVRIQPSIHDHN IPTLEAVVGVPQPPSEGPITHQWSVQMEPPVPCHYEDLERLPDAAEP CLPGALFRCPVVFQRQEILVQVIGTLELVGEIEASSMFSLCSSLSISF NSSKHFLHLYGSNASLAQVVMKVDVVYEKQML	
77	QECTKFVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTGPGDPDSIRCDTRPQLL MRGCAADDIMDPTSLAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFN VTFRRAKGYPIDLYYLMDSLYSMLDDLNRNVKKLGGDLLRALNEITES GRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPDKLRNPCPNKEKECQPPFAFRHVLKL TNNSNQFQTEVGKQLISGNLDAPEGGLDAMMQVAACPEEIGWRNVTR LLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNEFDYPSV GQLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSSN VVQLIKNAYNKLSSRVFLDHNAIPDTLKVITYDSFCNGVTHRNQPRG DCDGVQINVPITFQVKVTATECIEQSFVIRALGFTDIVTVQVLPQC ECRCRDQSRDRSLCHGKGFLECGICRCDTGYIGKNCECQTQGRSSQE LEGSCRKDNNIICSGLGDCVCGQCLCHTSDVPGKLIYGQYCECDTI NCERYNGQVCGGPGRGLCFGKCRCHPGFECSACQCERTTEGCLNPR RVECSGRGRRCRCNVCECHSGYQLPLCQCEPGCPSPCGKYISCAECLK FEKGPFGKNCSAACPGQLSNNPVKGRTCKERDSEGCWVAYTLEQQD GMDRYLIYVDESRECVAGPN	LFA-1 β 細胞外 ドメイン(ECD)
78	WTYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPFERS YYWIGIRKIGGIWTVGTNKSLEEAENWGDGEPNNKKNKEDCVEIY IKRNKDAGKWNDDACHKLKAALCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYT CNCVGYGYPQCQFVIQCEPLEAPELGTMDCTHPLGNFSFSSQCAF CSEGTNLTGIEETTCTGPFGNWSSPEPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCS HPLASFSTTACTFICSEGTELIGKKKTICESSGIWSNPSPICQKLD KSFSMIKEGDYN	L-セレクチン 細胞外ドメイン (ECD)
79	FKIETTPESRYLAQIGDSVSLTCSTTGCESPFFSWRTQIDSPLNGKV TNEGTTSTLTMPVSVFGNEHSYLCTATCESRKLEKGIQVEIYSFPKD PEIHLSGPLEAGKPITVKCSVADVYPFDRLEIDLKGDHLMKSQEF EDADRKSLETKSLEVTFTPVIEDIGKVLVCRAKLHIDEMDSVPTVRQ AVKELQVYISPKNVTISVNPSTKLQEGGSVTMTCSSEGLPAPEIFWS KKLDNGLNLQHLSGNATLTLIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVEL IVQEKPFTEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSVMGCESPSFSWRTQIDS PLSGKVRSEGTNSTLTLSPVSFENEHSYLCTVTTCGHKKLEKGIQVEL YSFPRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCKVPSVYPLDRLEIELLKGETIL ENIEFLEDTDMKSLENKSLEMTFIPTIEDTGKALVCQAKLHIDDMEF EPKQRQSTQTLVNVAPRDTTVLVSPSSILEEGSSVNMTCLSQGFP PKILWSRQLPNGELQPLSENATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRS RKEVELIIQVTPKDIKLTAFPSSESVKEGDTVIIISCTCGNVPETWII KKKAETGDTVLSIDGAYTIRKAQLKDAGVYECESKNKVGSQLRSLT LDVQGRENNKDYFSPE	VCAM-1 細胞外ドメイン (ECD)
80	NVDTESALLYQGPHTLFGYSVVLHSHGANRWLLVGAPTANWLANAS VINPGAIRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWL VTLRQPGENGSIIVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGVPPDLRTE LSKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGSSYWT GSLFVYNITITNKYKAFLDKQNVKFGSYLGYSVGAGHFRSQHTTEV	VLA-4 細胞外 ドメイン(ECD)

10

20

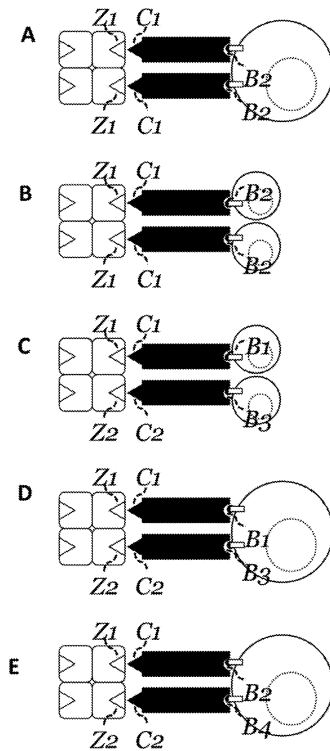
30

40

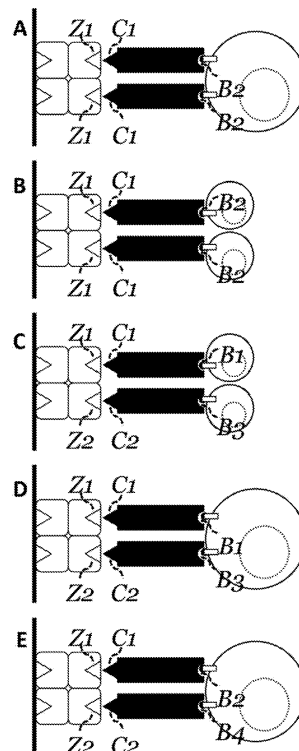
No.	配列	説明
	GGAPQHEQIGKAYIFS IDEKELN I LHEMKGK K LGSYFGASVCAVDLN ADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVFVYINSGSGAVMNAME TNLVGSDK YAARFGESIVNLGDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIYINGRADGI SSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSISGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDS AVLLRTRPVVIVDASLSHPESVNR TKFDCVENGWPSVCIDLTLCF SY KGKEVPGYIVLFYNMSLDVNRKAESP R FYFSSNGTSDVITGSIQVS SREANCRTHQAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPP LQPILQQKKEKDIMKKTINFARFCAHENC SADLQVSAKIGFLKPHEN KTYLAVGSMKTLMLNVSLFNAGDDAYETTLHVKL PVGLYFIKILELE EKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGYIYVDHLSRIDISFLLDVSSLSRAE EDLSITVHATCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLKYE VKLTVHGFVNPTS FVYGSNDENEPETCMVEKMNLTFHVINTGNSMAPNVSV EIMVPNSFS PQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQRVCALEQQKSAMQTLKGIVRFL SKTDKRLLYCIKADPHCLNFLCNFGKMESGKEASVHIQLEGRPSILE MDETSALKFEIRATGFPEPNPRVIELNKDENVAHVLL EGLHHQRPKR YFT	
81	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVT SCLCLGIPSDNCT RPCFSERLSQMTNTT MQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSCEQP CNQTTAGNALTF LKSLLEIFQKEKMRGMRGKI	IL-9

10

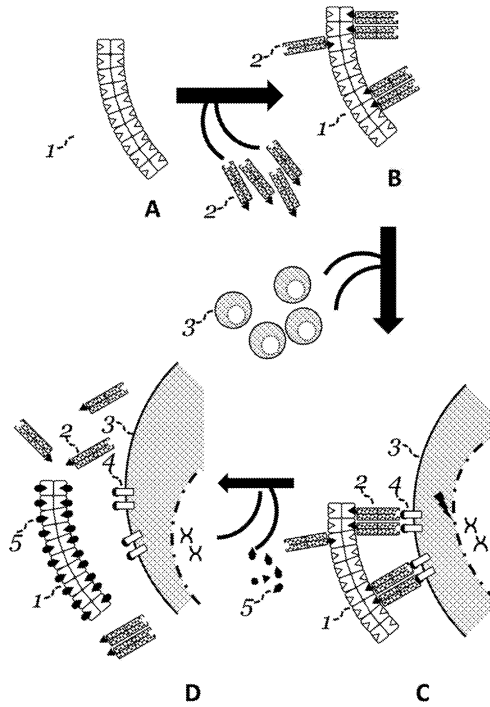
【図 1】



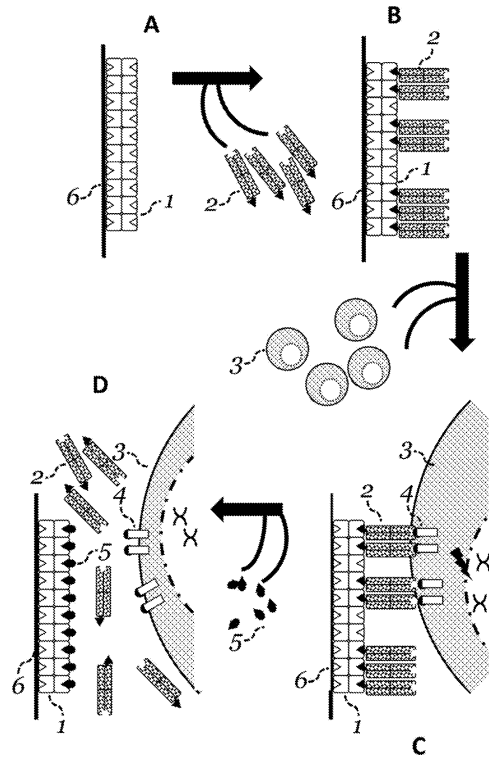
【図 2】



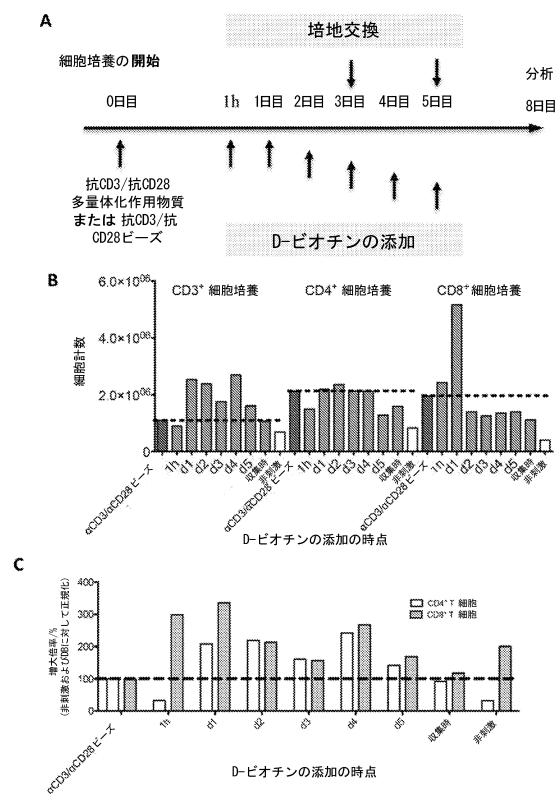
【図 3】



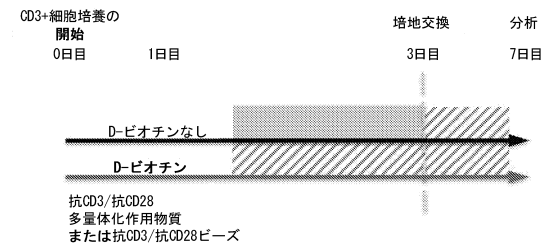
【図 4】



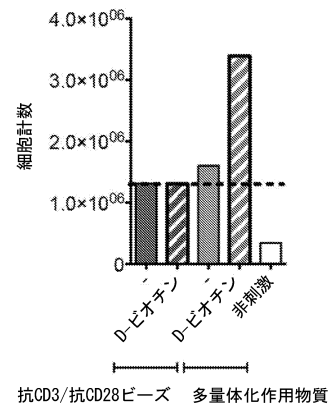
【図 5】



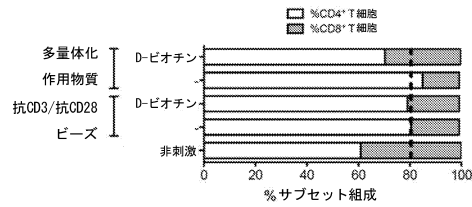
【図 6 A】



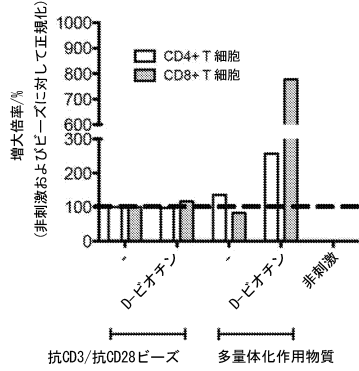
【図 6 B】



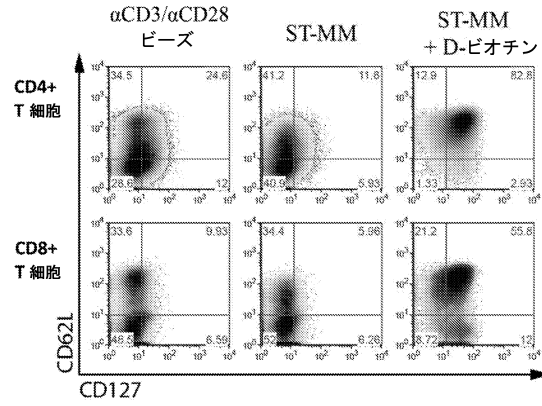
【図 6 C】



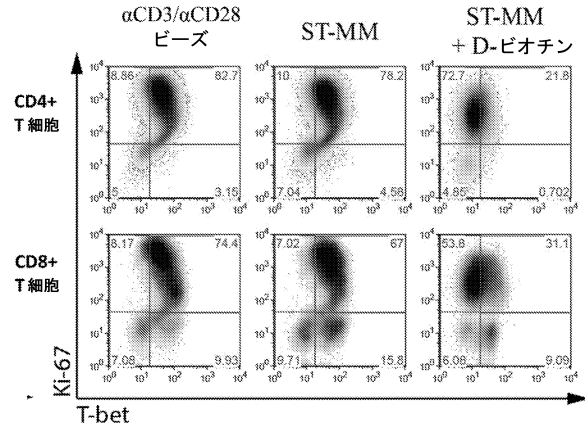
【図 6 D】



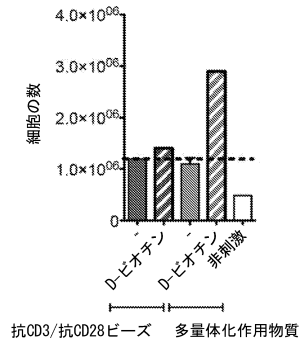
【図 6 E】



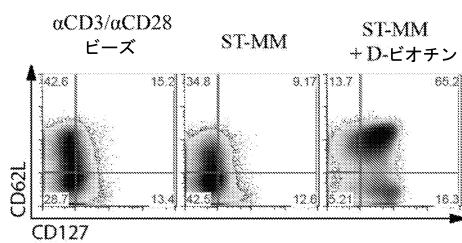
【図 6 F】



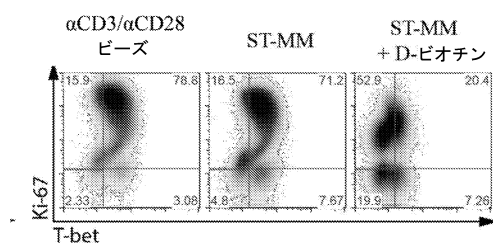
【図 7 A】



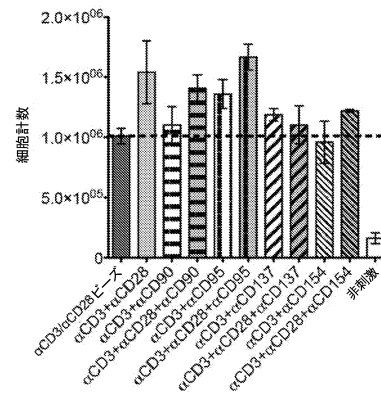
【図 7 B】



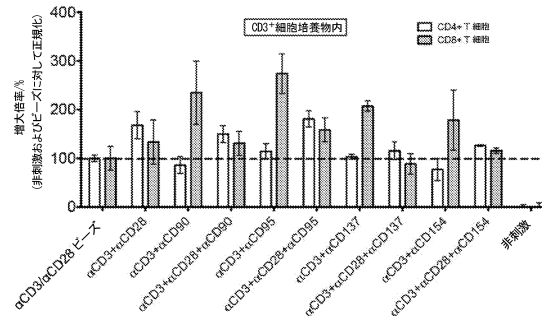
【図 7 C】



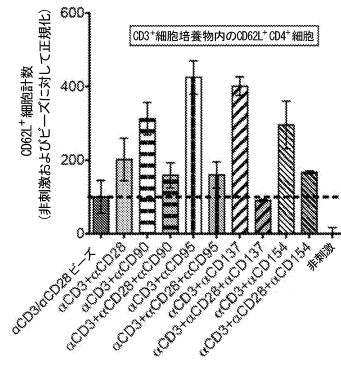
【図 8 A】



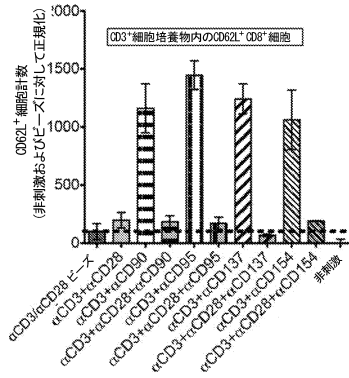
【図 8 B】



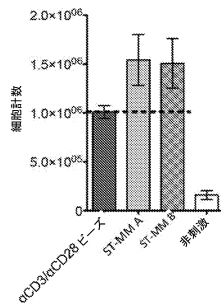
【図 8 C】



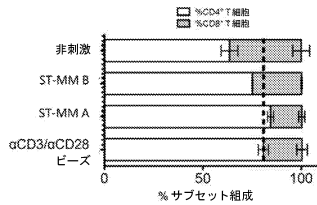
【図 8 D】



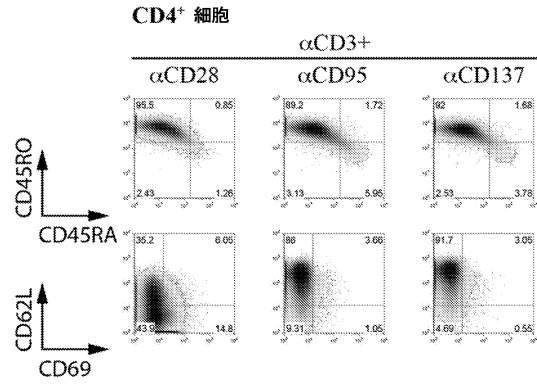
【図 9 A】



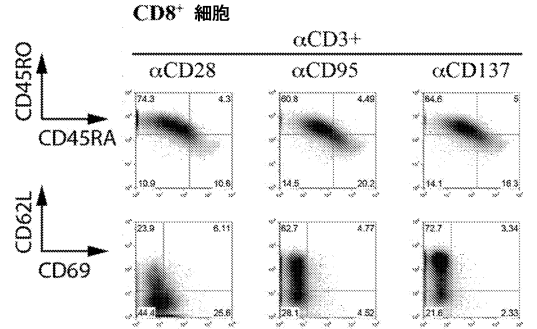
【図 9 B】



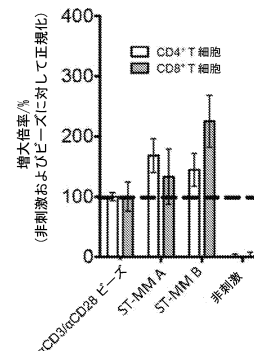
【図 8 E】



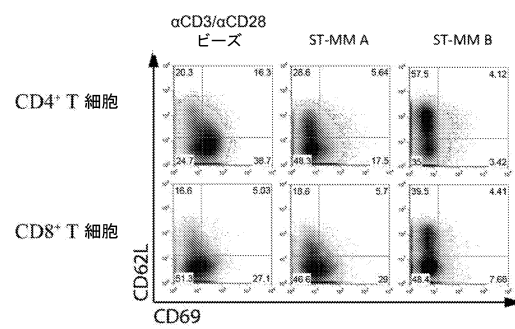
【図 8 F】



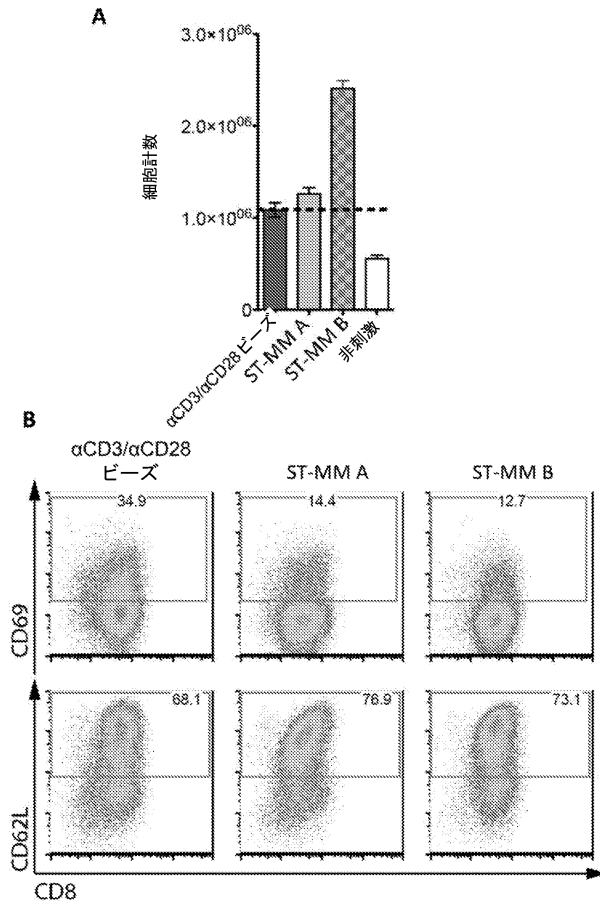
【図 9 C】



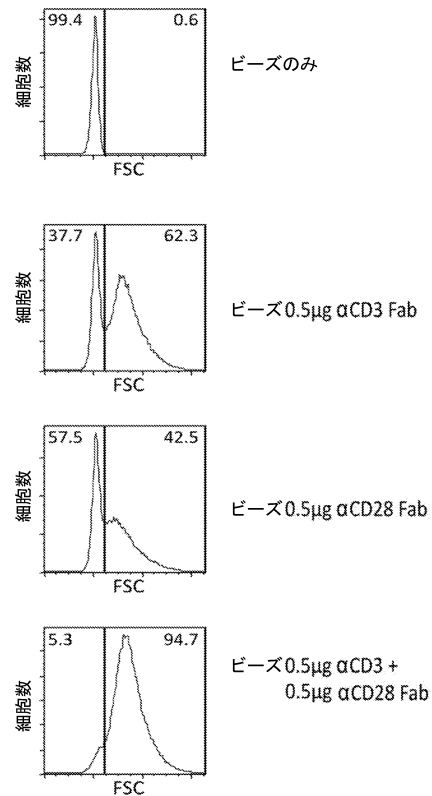
【図 9 D】



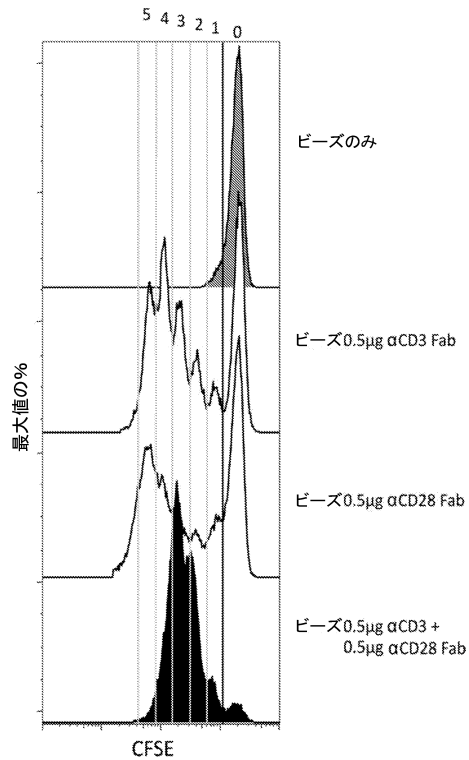
【図 10】



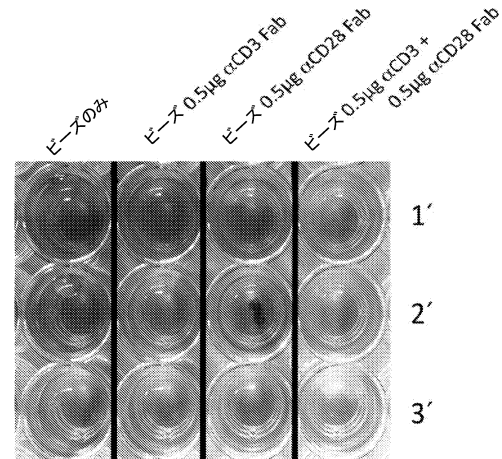
【図 11 A】



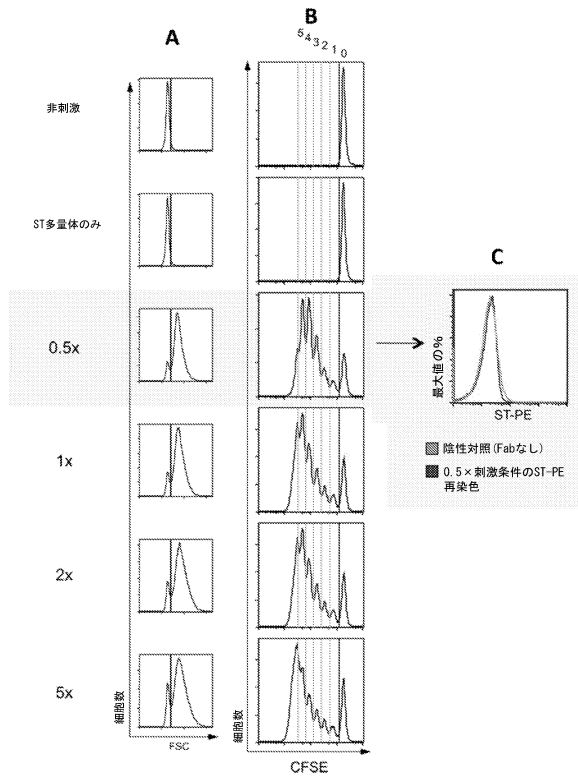
【図 11 B】



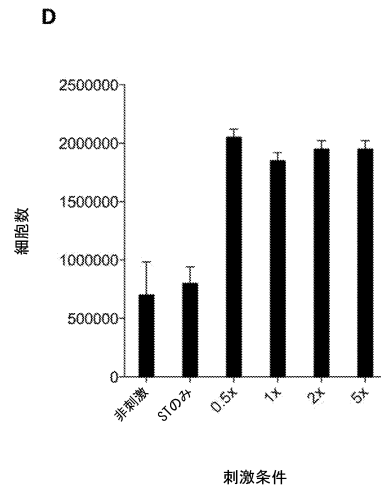
【図 11 C】



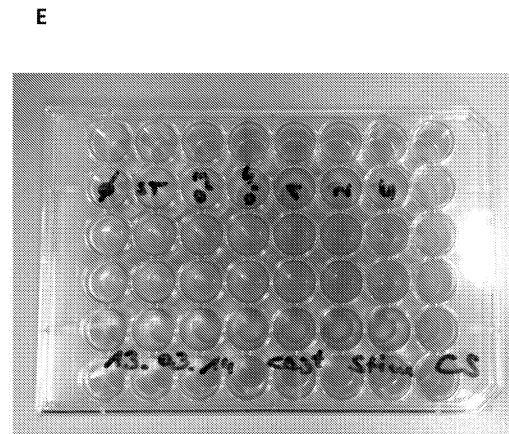
【図 12-1】



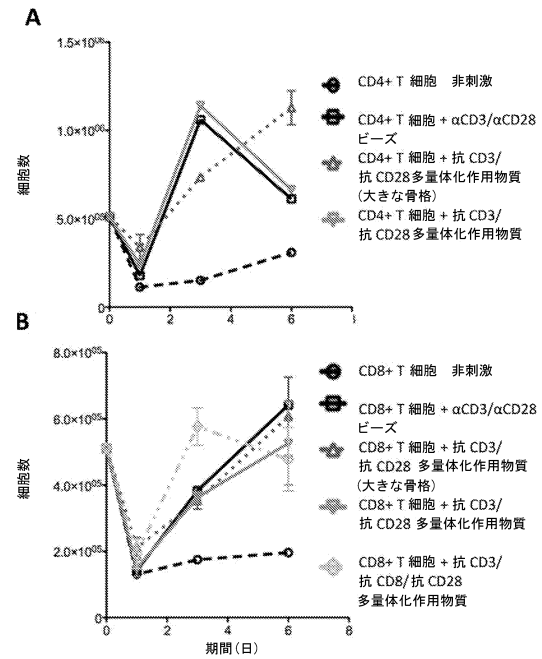
【図 12-2】



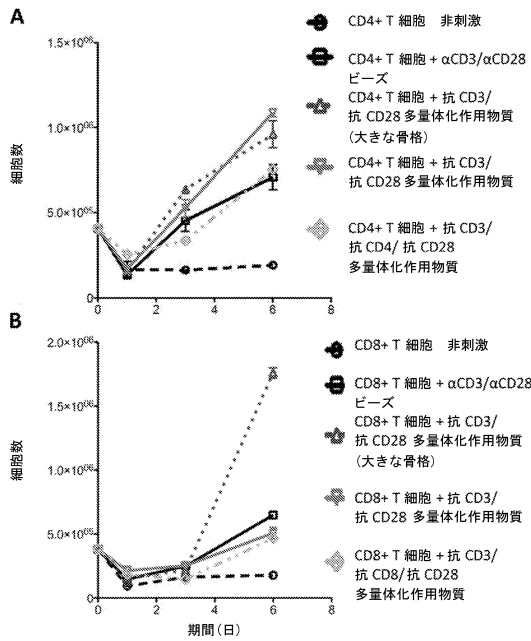
【図 12-3】



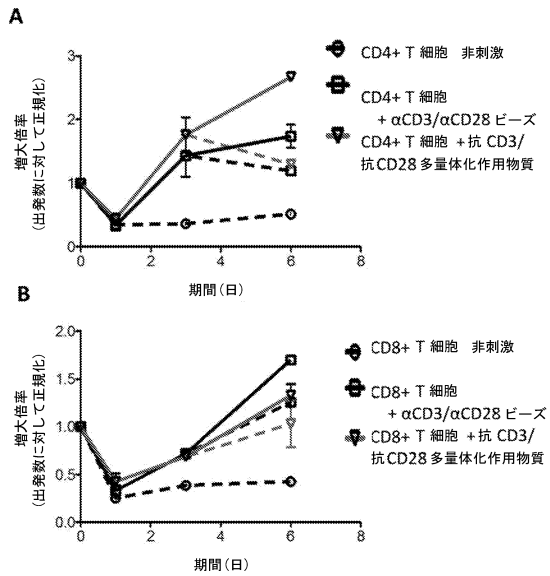
【図 13】



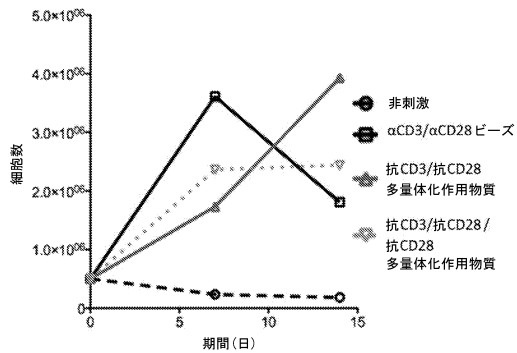
【図 14】



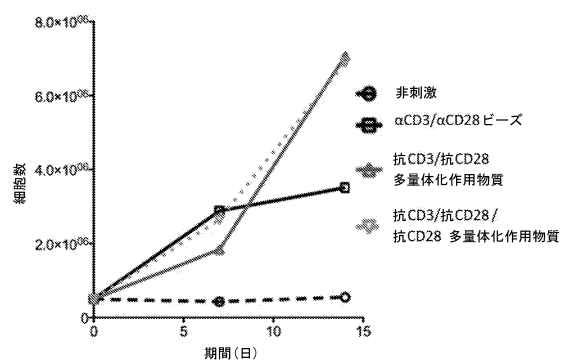
【図 15】



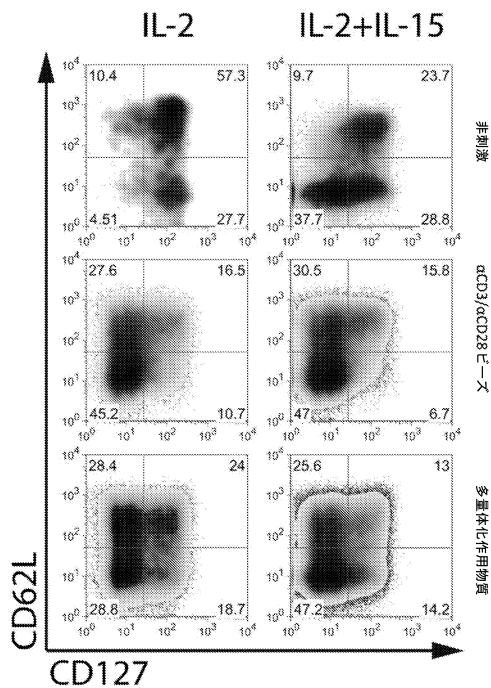
【図 16 A】



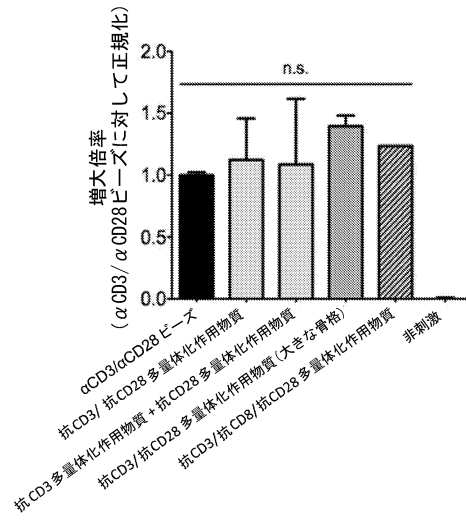
【図 16 B】



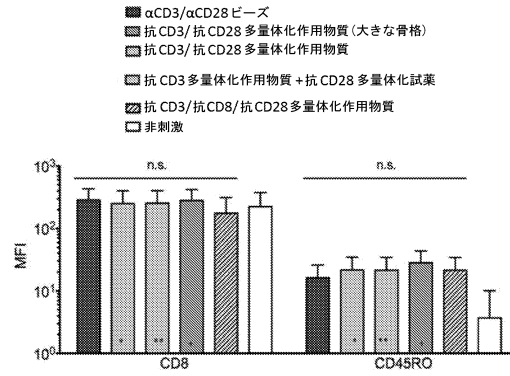
【図 16 C】



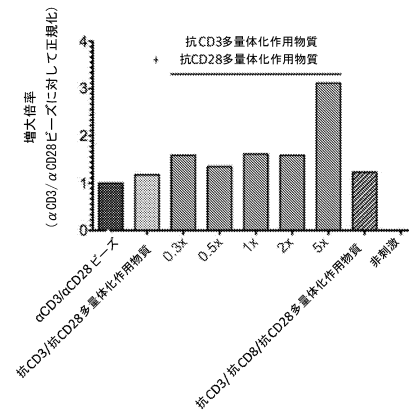
【図 17 A】



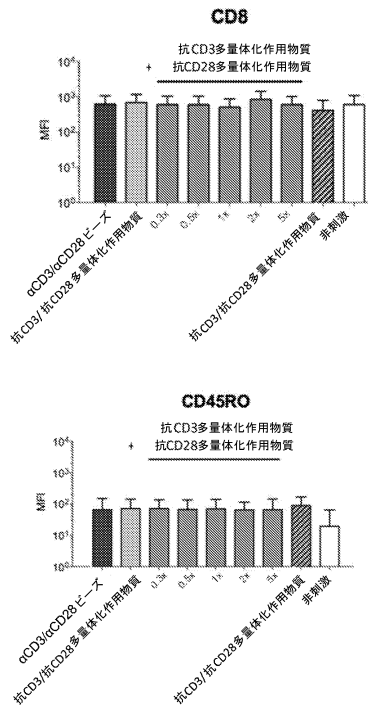
【図 17 B】



【図 18 A】

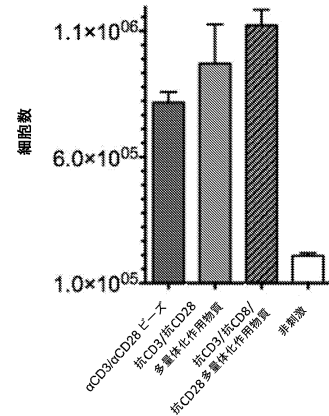


【図 18 B】

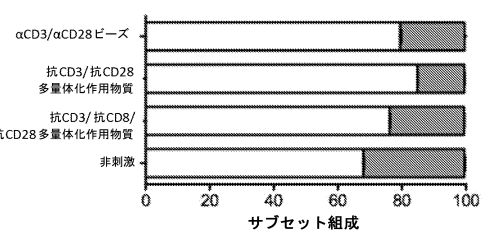


【図 19】

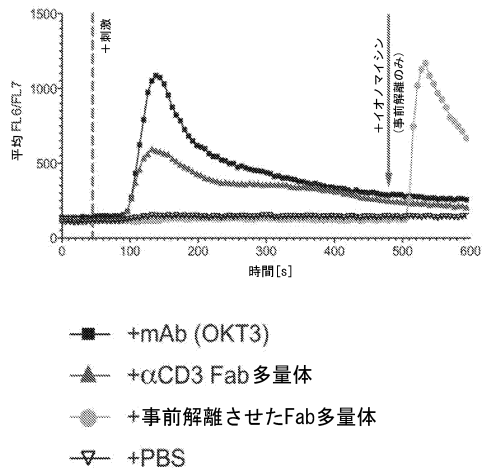
A



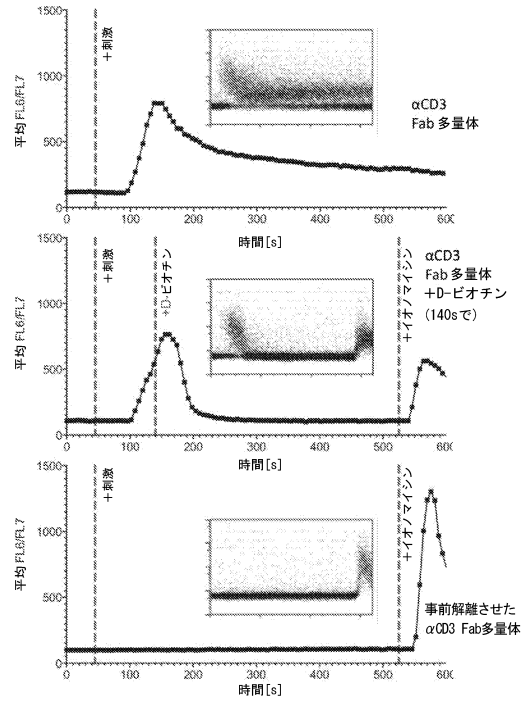
B



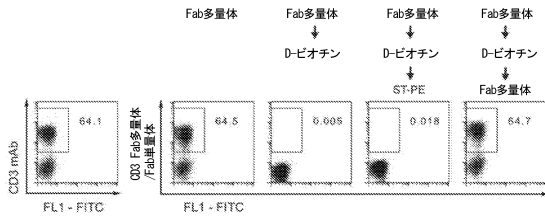
【図 20 A】



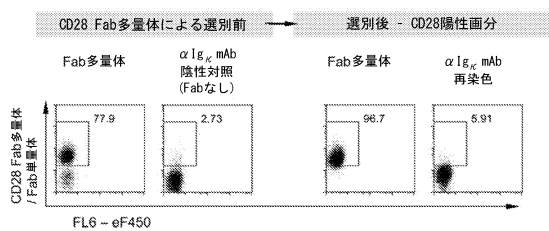
【図 20 B】



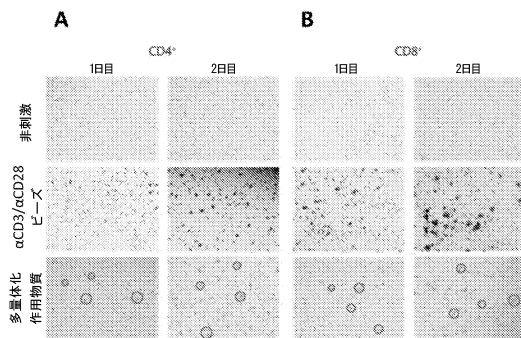
【図 21】



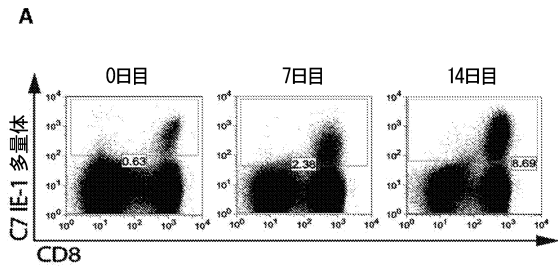
【図 22】



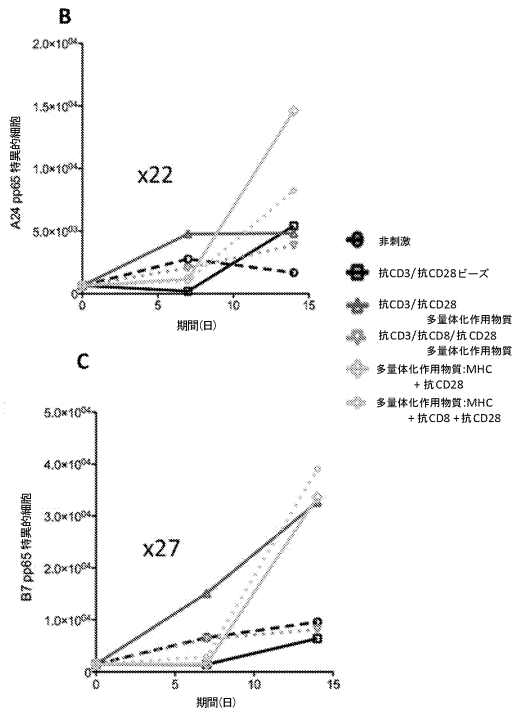
【図 23】



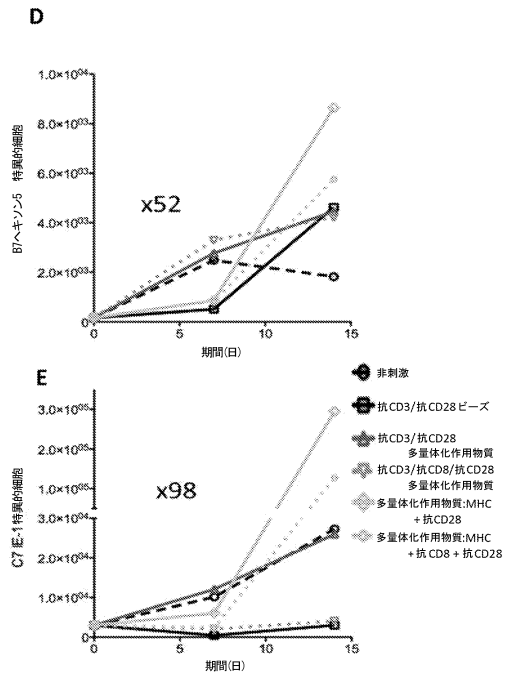
【図 24 - 1】



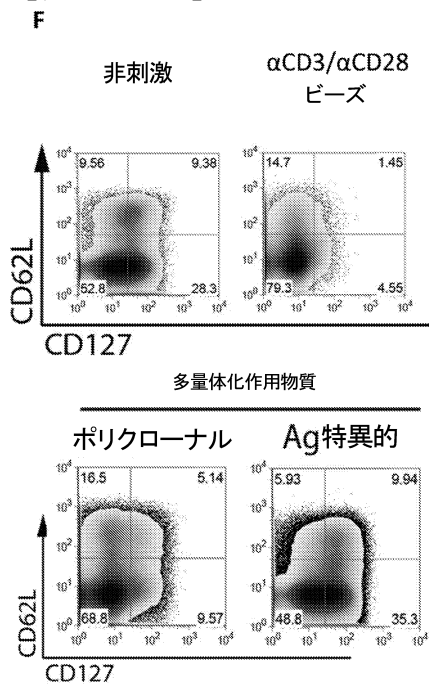
【図 2 4 - 2】



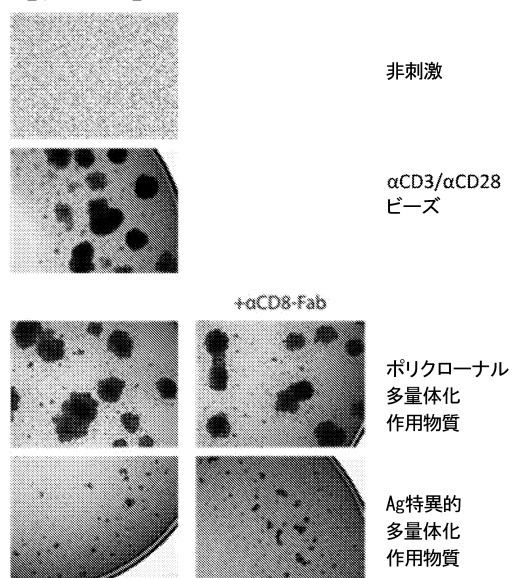
【图 2 4-3】



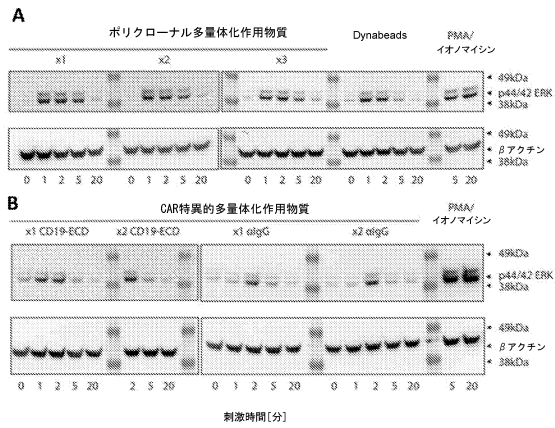
【図 24-4】



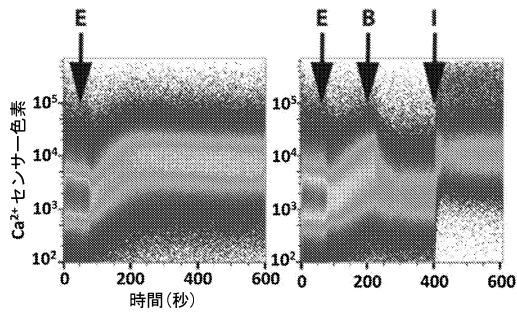
【図 25】



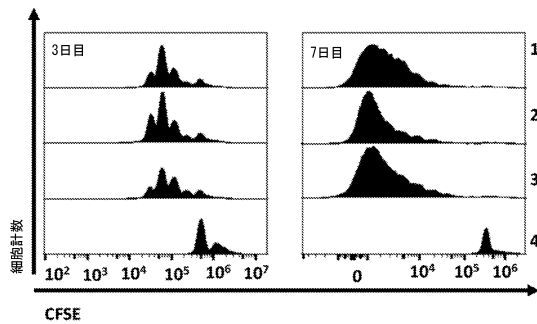
【図 26】



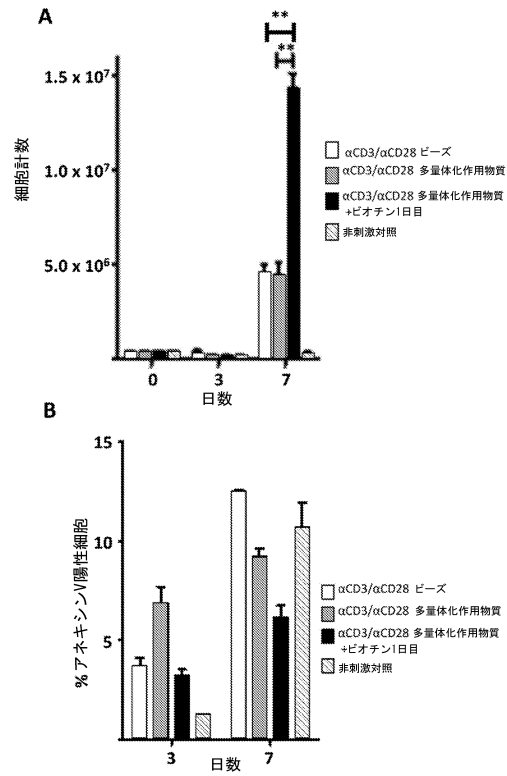
【図 27】



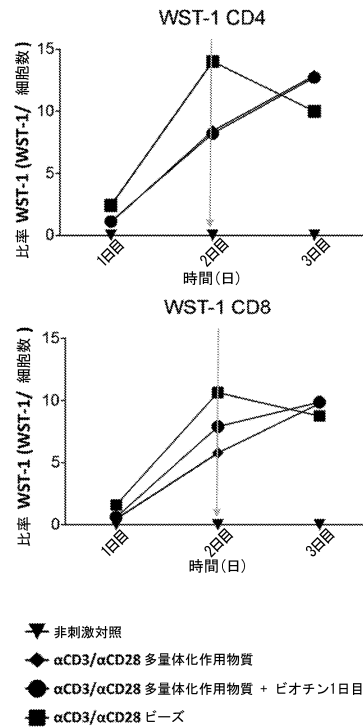
【図 29】



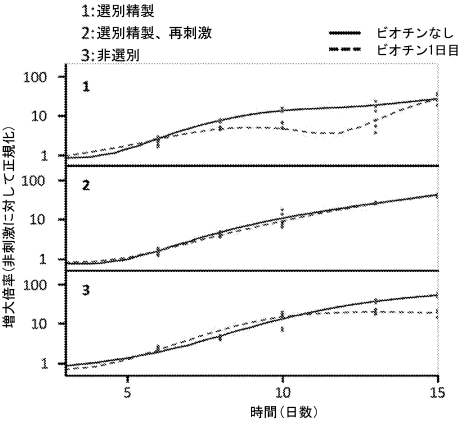
【図 28】



【図 30】



【図 3 1】



【配列表】

0006895959000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- | | | | | | |
|---------|--------|-----------|---------|--------|---|
| C 0 7 K | 14/705 | (2006.01) | C 0 7 K | 14/705 | |
| A 6 1 K | 35/17 | (2015.01) | A 6 1 K | 35/17 | Z |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 37/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 31/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/00 | |
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ゲルメロート ローター
ドイツ連邦共和国 3 7 0 7 9 ゲッティンゲン ルドルフ - ヴィセル - シュトラーセ 2 8
- (72)発明者 シュテムベルガー クリスティアン
ドイツ連邦共和国 3 7 0 7 9 ゲッティンゲン ルドルフ - ヴィセル - シュトラーセ 2 8
- (72)発明者 グラフ パトリツィア
ドイツ連邦共和国 3 7 0 7 9 ゲッティンゲン ルドルフ - ヴィセル - シュトラーセ 2 8
- (72)発明者 バシユアワ キーナン
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0
0 スイート 1 2 0 0

審査官 佐久 敬

- (56)参考文献 特表2014-529361 (JP, A)
特表2006-516197 (JP, A)
特表2004-525354 (JP, A)
国際公開第2014/076277 (WO, A1)
特表2017-513524 (JP, A)
PLoS One (2012), 7(4), e35798

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
C 0 7 K
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)