(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-520518
(P2016-520518A)
(43)公表日　平成28年7月14日(2016.7.14)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C07K 17/02 | (2006.01) | C07K | 17/02 | ZNA | 4B065 |
| C07K 14/705 | (2006.01) | C07K | 14/705 | | 4C076 |
| C07K 19/00 | (2006.01) | C07K | 19/00 | | 4C084 |
| C07K 16/00 | (2006.01) | C07K | 16/00 | | 4C085 |
| A61K 35/17 | (2015.01) | A61K | 35/17 | | 4C087 |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 104 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-501989 (P2016-501989)
(86)(22)出願日　平成26年3月13日 (2014.3.13)
(85)翻訳文提出日　平成27年11月6日 (2015.11.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/025889
(87)国際公開番号　WO2014/160132
(87)国際公開日　平成26年10月2日 (2014.10.2)
(31)優先権主張番号　61/786,135
(32)優先日　平成25年3月14日 (2013.3.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/942,797
(32)優先日　平成26年2月21日 (2014.2.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　398076227
ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
アメリカ合衆国、メリーランド州　２１２１８、ボルチモア、ノース・チャールズ・ストリート　３４００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　シュネック，　ジョナサン
アメリカ合衆国　メリーランド　２０９０２，　シルバー　スプリング，　ヤーットマン　コート　５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ナノスケール人工抗原提示細胞

(57)【要約】
本開示は、免疫療法のための強力なツールとしての使用のため、刺激シグナルを、細胞傷害性リンパ球を含むリンパ球に送達する、ナノスケール人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）を提供する。本開示は、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含むナノａＡＰＣを提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）であって、
ナノ粒子と、
前記ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのリンパ球に影響する分子と、
抗原に結合すると、抗原特異的リンパ球受容体受容体とかみ合う、前記ナノ粒子の前記前記表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含む、前記ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）。
【請求項２】
前記ナノ粒子が直径５０～１００ｎｍである、請求項１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３】
前記ナノ粒子が量子ドットである、請求項１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４】
前記ナノ粒子が常磁性である、請求項１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項５】
前記ナノ粒子が生分解性である、請求項１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項６】
前記ナノ粒子がプラスチックを含む、請求項１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項７】
架橋抗体またはオリゴマー化分子をさらに含む、請求項１～６のいずれかに記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項８】
前記少なくとも１つのリンパ球に影響する分子がＴ細胞に影響する分子であり、前記分子複合体が少なくとも１つの抗原結合間隙を含む抗原提示複合体である、請求項１～７のいずれかに記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項９】
前記少なくとも１つの抗原提示複合体がＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１０】
前記少なくとも１つの抗原提示複合体がＭＨＣクラスＩ分子を含む、請求項９に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１１】
前記少なくとも１つの抗原提示複合体が、少なくとも２つの融合タンパク質を含むＭＨＣクラスＩ分子複合体であり、第１の融合タンパク質が第１のＭＨＣクラスＩα鎖及び第１の免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が第２のＭＨＣクラスＩα鎖及び第２の免疫グロブリン重鎖を含み、前記第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、前記ＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成し、前記ＭＨＣクラスＩ分子複合体が第１のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙及び第２のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む、請求項９に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１２】
前記少なくとも１つの抗原提示複合体がＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を含む、請求項１～７のいずれかに記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１３】
前記抗原提示複合体がＭＨＣクラスＩＩ分子である、請求項１２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１４】
前記抗原提示複合体が、少なくとも４つの融合タンパク質を含むＭＨＣクラスＩＩ分子複合体であり、
（ａ）２つの第１の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメインと、を含み、

（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインと、を含み、
前記２つの第１の融合タンパク質及び前記２つの第２の融合タンパク質が会合して、前記ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体を形成し、各第１の融合タンパク質の前記ＭＨＣクラスＩＩβ鎖の前記細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質の前記ＭＨＣクラスＩＩα鎖の前記細胞外ドメインがＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を形成する、請求項１２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１５】
前記免疫グロブリン重鎖が可変領域を含む、請求項１４に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１６】
抗原ペプチドが前記少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１７】
前記抗原ペプチドが、腫瘍関連抗原のペプチド、自己抗原のペプチド、同種抗原のペプチド、及び感染病原体抗体のペプチドからなる群から選択される、請求項１６に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１８】
少なくとも２つの抗原提示複合体を含む、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項１９】
同一の抗原が、前記少なくとも２つの抗原提示複合体の各抗原結合間隙に結合する、請求項１８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２０】
異なる抗原が、前記少なくとも２つの抗原提示複合体の各抗原結合間隙に結合する、請求項１８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２１】
第１の抗原提示複合体が、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含み、第２の抗原提示複合体が、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を含む、請求項１８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２２】
前記少なくとも１つの抗原提示複合体が非古典的なＭＨＣ様分子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２３】
前記非古典的なＭＨＣ様分子がＣＤ１ファミリーメンバーである、請求項２２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２４】
前記非古典的なＭＨＣ様分子が、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、及びＣＤ１ｅからなる群から選択される、請求項２３に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２５】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子がＴ細胞共刺激分子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２６】
前記Ｔ細胞共刺激分子が、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、Ｂ７－Ｈ３、４－１ＢＢＬ、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ１３４（ＯＸ－４０Ｌ）、Ｂ７ｈ（Ｂ７ＲＰ－１）、ＣＤ４０、ＬＩＧＨＴ、ＣＤ２８に特異的に結合する抗体、ＨＶＥＭに特異的に結合する抗体、ＣＤ４０Ｌに特異的に結合する抗体、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体、及び４－１ＢＢに特異的に結合する抗体からなる群から選択される、請求項２５に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２７】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子が接着分子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。

【請求項２８】
前記接着分子が、ＩＣＡＭ－１及びＬＦＡ－３からなる群から選択される、請求項２７に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項２９】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子がＴ細胞成長因子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３０】
前記Ｔ細胞成長因子がサイトカイン及び超抗原からなる群から選択される、請求項２９に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３１】
前記Ｔ細胞成長因子がサイトカインであり、前記サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びγインターフェロンからなる群から選択される、請求項２９に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３２】
前記Ｔ細胞成長因子が、
（Ａ）少なくとも２つの融合タンパク質を含む第１の分子複合体であって、第１の融合タンパク質が第１のサイトカイン及び免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が第２のサイトカイン及び第２の免疫グロブリン重鎖を含み、前記第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、前記第１の分子複合体を形成する、第１の分子複合体、ならびに
（Ｂ）少なくとも４つの融合タンパク質を含む第２の分子複合体であって、
（ａ）２つの第１の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）第１のサイトカインと、を含み、
（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）第２のサイトカインと、を含み、
前記２つの第１の融合タンパク質及び前記２つの第２の融合タンパク質が会合して、前記第２の分子複合体を形成する、第２の分子複合体、からなる群から選択される、請求項２９に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３３】
前記Ｔ細胞成長因子が前記第１の分子複合体である、請求項３２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３４】
前記第１及び第２のサイトカインが同一である、請求項３２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３５】
前記第１及び第２のサイトカインが異なる、請求項３２に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３６】
前記Ｔ細胞成長因子が前記第２の分子複合体である、請求項３３に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３７】
前記第１及び第２のサイトカインが同一である、請求項３６に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３８】
前記第１及び第２のサイトカインが異なる、請求項３６に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項３９】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子が制御性Ｔ細胞インデューサー分子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４０】
前記少なくとも１つの制御性Ｔ細胞インデューサー分子が、ＴＧＦβ、ＩＬ－１０、インターフェロン－α、及びＩＬ－１５からなる群から選択される、請求項３９に記載の前

記ナノａＡＰＣ。
【請求項４１】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子がアポトーシス誘導分子である、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４２】
前記アポトーシス誘導分子が、毒素、ＴＮＦα、及びＦａｓリガンドからなる群から選択される、請求項４１に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４３】
少なくとも２つの異なるＴ細胞に影響する分子を含む、請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４４】
ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）であって、
ナノ粒子と、
前記ナノ粒子の前記表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、
Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う前記ナノ粒子の前記表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含む、前記ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）。
【請求項４５】
前記少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子がＣＤ４０リガンドである、請求項４４に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４６】
前記分子複合体がＴ細胞受容体（ＴＣＲ）である、請求項４４に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４７】
前記分子複合体が少なくとも４つの融合タンパク質を含むＴＣＲ分子複合体であり、
（ａ）２つの第１の融合タンパク質が（ｉ）ＴＣＲα鎖またはＴＣＲγ鎖を含み、
（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲβ鎖またはＴＣＲδ鎖の細胞外ドメインと、を含み、前記２つの第１の融合タンパク質が前記ＴＣＲα鎖を含む場合、前記２つの第２の融合タンパク質は前記ＴＣＲβ鎖を含み、前記２つの第１の融合タンパク質が前記ＴＣＲγ鎖を含む場合、前記２つの第２の融合タンパク質は前記ＴＣＲδ鎖を含み、
前記２つの第１の融合タンパク質及び前記２つの第２の融合タンパク質が会合して、前記ＴＣＲ分子複合体を形成し、各第１の融合タンパク質の前記ＴＣＲαまたはγ鎖の前記細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質の前記ＴＣＲβまたはδ鎖の前記細胞外ドメインが、ＴＣＲ抗原結合間隙を形成する、請求項４４に記載の前記ナノａＡＰＣ。
【請求項４８】
ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）であって、
ナノ粒子と、
前記ナノ粒子の前記表面上の少なくとも１つのＴ細胞共刺激分子と、
前記ナノ粒子の前記表面上の少なくとも１つのＭＨＣクラスＩ分子複合体と、を含み、前記少なくとも１つのＭＨＣクラスＩ分子複合体が、少なくとも２つの融合タンパク質を含み、第１の融合タンパク質が第１のＭＨＣクラスＩα鎖及び第１の免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が第２のＭＨＣクラスＩα鎖及び第２の免疫グロブリン重鎖を含み、前記第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、前記ＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成し、前記ＭＨＣクラスＩ分子複合体が、第１のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙及び第２のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む、前記ナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）。
【請求項４９】
前記少なくとも１つのＴ細胞共刺激分子が、ＣＤ２８に特異的に結合する抗体である、請求項４８に記載の前記ナノａＡＰＣ。

【請求項５０】
請求項１～４９のいずれかに記載の複数のナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）を含む調製物。
【請求項５１】
薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項５０に記載の前記調製物。
【請求項５２】
抗原特異的Ｔ細胞の形成の誘導方法であって、
複数の前駆Ｔ細胞を含む単離された調製物を、抗原が抗原結合間隙に結合する、請求項８に記載の少なくとも１つの第１のナノａＡＰＣと接触させ、それによって、前記複数の前駆Ｔ細胞のメンバーを、前記抗原を認識する抗原特異的Ｔ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導することを含み、前記第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合は、前駆Ｔ細胞が、ＣＤ３に特異的に結合する抗体を含むが、抗原提示複合体を含まないナノａＡＰＣとともにインキュベートされる場合に形成される抗原特異的Ｔ細胞の数または割合を超える、前記方法。
【請求項５３】
前記抗原特異的Ｔ細胞が細胞傷害性Ｔ細胞である、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項５４】
前記抗原特異的Ｔ細胞がヘルパーＴ細胞である、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
前記抗原特異的Ｔ細胞が制御性Ｔ細胞である、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項５６】
前記抗原特異的Ｔ細胞を前記第１の細胞集団から分離することをさらに含む、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項５７】
前記第１の細胞集団を、抗原が前記粒子の前記抗原結合間隙に結合する、少なくとも１つの請求項７に記載の第２のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることをさらに含み、前記インキュベートが、前記第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗原特異的Ｔ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項５８】
前記抗原が同一である、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項５９】
前記抗原が異なる、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項６０】
前記単離された調製物が少なくとも２つの第１のナノａＡＰＣと接触し、異なる抗原が第１のナノａＡＰＣのそれぞれに結合する、請求項５２に記載の前記方法。
【請求項６１】
細胞の集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合の増加方法であって、
抗原特異的Ｔ細胞を含む第１の細胞集団を、抗原が前記抗原結合間隙に結合する、少なくとも１つの請求項８に記載の第１のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含み、前記インキュベートが、前記第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗原特異的Ｔ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される、前記方法。
【請求項６２】
前記第１の細胞集団が均質細胞集団である、請求項６１に記載の前記方法。
【請求項６３】
前記抗原特異的Ｔ細胞を患者に投与することをさらに含む、請求項６２に記載の前記方法。
【請求項６４】
前記患者が、癌、自己免疫疾患、感染症を有するか、または免疫抑制させられている、

請求項６３に記載の前記方法。
【請求項６５】
前記前駆Ｔ細胞が前記患者から得られる、請求項６３に記載の前記方法。
【請求項６６】
前記前駆Ｔ細胞が前記患者ではないドナーから得られる、請求項６３に記載の前記方法。
【請求項６７】
前記抗原特異的Ｔ細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路によって投与される、請求項６３に記載の前記方法。
【請求項６８】
前記第２の集団の前記抗原特異的Ｔ細胞を前記患者に投与することをさらに含む、請求項６１に記載の前記方法。
【請求項６９】
患者の免疫応答の調節方法であって、
（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与することを含み、前記複数の粒子のメンバーが、
（１）少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子と、
（２）少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含み、前記少なくとも１つの抗原提示複合体が少なくとも１つの抗原結合間隙を含み、抗原が前記少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する、前記方法。
【請求項７０】
前記少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子が、（１）アポトーシス誘導分子、（２）制御性Ｔ細胞誘導分子、（３）Ｔ細胞共刺激分子、（４）接着分子、及び（５）Ｔ細胞成長因子からなる群から選択される、請求項６９に記載の前記方法。
【請求項７１】
患者の免疫応答の抑制方法であって、
（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与するステップを含み、前記複数の粒子のメンバーが、
（１）少なくとも１つのアポトーシス誘導分子と、
（２）少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含み、前記少なくとも１つの抗原提示複合体が少なくとも１つの抗原結合間隙を含み、抗原が前記少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する、前記方法。
【請求項７２】
集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合の増加方法であって、
複数の前駆Ｂ細胞を含む単離された調製物を、少なくとも１つの請求項４４に記載の第１のナノａＡＰＣと接触させ、それによって、前記複数の前駆Ｂ細胞のメンバーを、前記抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を産生する抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導するステップを含む、前記方法。
【請求項７３】
前記第１の細胞集団から、抗体を産生するＢ細胞を分離することをさらに含む、請求項７２に記載の前記方法。
【請求項７４】
前記第１の細胞集団を、少なくとも１つの請求項４３に記載の第２のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることをさらに含み、前記インキュベートが、前記第１の細胞集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗体産生Ｂ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される、請求項７２に記載の前記方法。
【請求項７５】
集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合の増加方法であって、

抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を、少なくとも１つの請求項４４に記載の第１のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることであって、前記インキュベートが、前記第１の細胞集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗体産生Ｂ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される、前記方法。

【請求項７６】

前記第１の細胞集団が均質細胞集団である、請求項７５に記載の前記方法。

【請求項７７】

集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合の増加方法であって、

複数の前駆Ｂ細胞を含む単離された調製物を、請求項４４に記載の前記調製物と接触させ、それによって、前記複数の前駆Ｂ細胞のメンバーを、前記抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を産生する抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導するステップを含む、前記方法。

【請求項７８】

患者の免疫応答の調節方法であって、

（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与することであって、前記複数の粒子のメンバーが、

（１）少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、

（２）Ｂ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う少なくとも１つの分子複合体と、を含む、前記方法。

【請求項７９】

前記少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子が、（１）ＣＤ４０リガンド、（２）サイトカイン、及び（３）サイトカイン分子複合体からなる群から選択される、請求項７８に記載の前記方法。

【請求項８０】

前記分子複合体が、Ｔ細胞受容体及び少なくとも４つの融合タンパク質を含むＴＣＲ分子複合体からなる群から選択され、

（ａ）２つの第１の融合タンパク質が（ｉ）ＴＣＲα鎖またはＴＣＲγ鎖を含み、

（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲβ鎖またはＴＣＲδ鎖の細胞外ドメインと、を含み、前記２つの第１の融合タンパク質が前記ＴＣＲα鎖を含む場合、前記２つの第２の融合タンパク質は前記ＴＣＲβ鎖を含み、前記２つの第１の融合タンパク質が前記ＴＣＲγ鎖を含む場合、前記２つの第２の融合タンパク質は前記ＴＣＲδ鎖を含み、

前記２つの第１の融合タンパク質及び前記２つの第２の融合タンパク質が会合して、前記ＴＣＲ分子複合体を形成し、各第１の融合タンパク質の前記ＴＣＲαまたはγ鎖の前記細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質の前記ＴＣＲβまたはδ鎖の前記細胞外ドメインが、ＴＣＲ抗原結合間隙を形成する、請求項７８に記載の前記方法。

【請求項８１】

ポリクローナルＴ細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の濃縮方法であって、前記ポリクローナルＴ細胞集団を、請求項７に記載の前記ナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含む、前記方法。

【請求項８２】

前記抗原特異的Ｔ細胞を前記ポリクローナルＴ細胞集団から分離することをさらに含む、請求項８１に記載の前記方法。

【請求項８３】

前記分離が、磁気濃縮カラム、フローサイトメトリー、または分画遠心法を使用して達成される、請求項８２に記載の前記方法。

【請求項８４】

前記ナノａＡＰＣの存在下で、前記抗原特異的Ｔ細胞を培養することをさらに含む、請求項８２または８３に記載の前記方法。

【請求項８５】

前記抗原特異的Ｔ細胞を患者に投与することをさらに含む、請求項８２～８４のいずれかに記載の前記方法。

【請求項８６】

Ｔ細胞の活性化方法であって、

磁場の存在下で、Ｔ細胞の集団を請求項８に記載の前記ナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含み、前記ナノａＡＰＣが常磁性である、前記方法。

【請求項８７】

前記インキュベーションが、３７℃で１０分間～３日間実行される、請求項８６に記載の前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本開示に引用される各参考文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本開示は免疫療法に関する。

【図面の簡単な説明】

【０００３】

【図１】鉄デキストランナノａＡＰＣの合成及び特性評価。ナノａＡＰＣは、２つの方法のうちの１つで合成された：図１Ａ、１：１モル比にある可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマー（シグナル１）及びＢ７．１－Ｉｇ（シグナル２）の、デキストランコーティングされた常磁性酸化鉄粒子の表面への直接化学結合。図１Ｂ、１：１モル比にあるビオチン化ＭＨＣ－Ｉｇダイマー（シグナル１）及びビオチン化抗ＣＤ２８（シグナル２）の、抗ビオチンコーティング粒子への結合。図１Ｃ、ナノ粒子トラッキング分析は、ナノａＡＰＣが８．３ｎＭの濃度で懸濁された５０～１００ｎｍの平均粒径を有する粒子の単分散混合物であることを確認する。

【０００４】

【図２－１】ナノａＡＰＣ誘導された増殖は抗原特異的及び用量依存的である。図２Ａ、抗原特異的ナノａＡＰＣは増殖を誘導する。ＴＣＲトランスジェニック２Ｃ（灰色）及びｐＭＥＬ（白色）Ｔ細胞は、非同族ペプチドまたは非同族ＭＨＣのいずれかを担持する粒子の存在下でなく、同族ＭＨＣ／ペプチドを担持する抗ビオチンコーティングされた粒子とともにインキュベートされたときのみ、増殖した。図２Ｂ、シグナル１及びシグナル２両方の付加は最適なＴ細胞増殖をもたらす。１×１０$^{6}$Ｔ細胞当たり１０μＬの粒子の用量では、ＭＨＣ－Ｉｇ及び抗ＣＤ２８両方を担持する抗ビオチン粒子のみが堅固なＴ細胞増殖を誘導した。図２Ｃ、３日目のＣＦＳＥ希釈による用量等価濃度でＬＤ及びＨＤ粒子によって誘導されたＣＤ８＋ＣＴＬの増殖。蛍光の減少は増殖の増加を示す。等体積のＨＤ粒子は、ＬＤ粒子よりも多い増殖を誘導し、０．５ｕＬのＬＤ粒子はほぼ増殖を誘導しない。図２Ｄ、（Ａ）における試料の７日目の増殖倍率は同様のパターンを示す。増殖は用量依存的であり、等価用量のＬＤ粒子と比較して、ＨＤ粒子に関して２～４倍多い。図２Ｅ、タンパク質等価濃度でＬＤ及びＨＤ粒子によって誘導された３日目のＣＤ８＋ＣＴＬのＣＦＳＥ希釈。粒子用量が等価のタンパク質濃度に正規化されるとき、粒子は同様の量の増殖を誘導する。図２Ｆ、（Ｃ）における試料の７日目の増殖倍率は、等価のタンパク質用量でのＨＤ及びＬＤ粒子に関する等価の増殖を示す。約０．５ｕＬのＬＤ粒子または０．０８ｕＬのＨＤ粒子の閾値が、検出可能な増殖を誘導するために必要とされる。

【図２－２】ナノａＡＰＣ誘導された増殖は抗原特異的及び用量依存的である。図２Ａ、抗原特異的ナノａＡＰＣは増殖を誘導する。ＴＣＲトランスジェニック２Ｃ（灰色）及びｐＭＥＬ（白色）Ｔ細胞は、非同族ペプチドまたは非同族ＭＨＣのいずれかを担持する粒子の存在下でなく、同族ＭＨＣ／ペプチドを担持する抗ビオチンコーティングされた粒子とともにインキュベートされたときのみ、増殖した。図２Ｂ、シグナル１及びシグナル２両方の付加は最適なＴ細胞増殖をもたらす。１×１０$^{6}$Ｔ細胞当たり１０μＬの粒子の用量では、ＭＨＣ－Ｉｇ及び抗ＣＤ２８両方を担持する抗ビオチン粒子のみが堅固なＴ細胞

増殖を誘導した。図２Ｃ、３日目のＣＦＳＥ希釈による用量等価濃度でＬＤ及びＨＤ粒子によって誘導されたＣＤ８＋ＣＴＬの増殖。蛍光の減少は増殖の増加を示す。等体積のＨＤ粒子は、ＬＤ粒子よりも多い増殖を誘導し、０．５ｕＬのＬＤ粒子はほぼ増殖を誘導しない。図２Ｄ、（Ａ）における試料の７日目の増殖倍率は同様のパターンを示す。増殖は用量依存的であり、等価用量のＬＤ粒子と比較して、ＨＤ粒子に関して２～４倍多い。図２Ｅ、タンパク質等価濃度でＬＤ及びＨＤ粒子によって誘導された３日目のＣＤ８＋ＣＴＬのＣＦＳＥ希釈。粒子用量が等価のタンパク質濃度に正規化されるとき、粒子は同様の量の増殖を誘導する。図２Ｆ、（Ｃ）における試料の７日目の増殖倍率は、等価のタンパク質用量でのＨＤ及びＬＤ粒子に関する等価の増殖を示す。約０．５ｕＬのＬＤ粒子または０．０８ｕＬのＨＤ粒子の閾値が、検出可能な増殖を誘導するために必要とされる。

【０００５】

【図３－１】Ｔ細胞機能特性評価。図３Ａ、ＣＤ８＋Ｔ細胞はＨＤ及びＬＤ粒子を使用して増殖された。粒子用量は、ＨＤ及びＬＤ粒子によって等価の増殖を誘導するため（それぞれ３．５ｕＬ及び２０ｕＬ）、かつより堅固な増殖を誘導するために（ＨＤ２０ｕＬ）選択された。試料は７日目に再刺激され、細胞内サイトカイン染色アッセイによってエフェクター機能を評価された。２０ｕＬのＨＤ試料（黒丸）、３．５ｕＬのＨＤ試料（黒く塗りつぶされた四角）、及び２０ｕＬのＬＤ試料（塗りつぶされていない四角）の全ては、ＣＤ１０７ａ及び（図３Ｃ）ＩＦＮγ産生によって測定された堅固で等価の用量依存的な（図３Ｂ）脱顆粒を誘導した。図３Ｄ、表面タンパク質ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの染色によって測定されたメモリエフェクター表現型。Ｔ細胞は、ナイーブ（ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＣＤ４４ｌｏ）、セントラルメモリ（ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＣＤ４４ｈｉ）、またはエフェクターメモリ（ＣＤ６２Ｌｌｏ、ＣＤ４４ｈｉ）に分類され得る。Ｅ）代表的なＦＡＣＳグラフはナノａＡＰＣ刺激の７日後に３つの集団を示す。図３Ｆ、Ｔ細胞は、２、１０、及び５０μＬのＬＤまたはＨＤ酸化鉄ナノａＡＰＣで刺激され、７日後に特性評価された。棒グラフは、刺激後に生成されたナイーブ（塗りつぶされていない）、Ｔｃｍ（灰色で塗りつぶされた）、及びＴｅｍ（黒色で塗りつぶされた）細胞の割合を示す。

【図３－２】Ｔ細胞機能特性評価。図３Ａ、ＣＤ８＋Ｔ細胞はＨＤ及びＬＤ粒子を使用して増殖された。粒子用量は、ＨＤ及びＬＤ粒子によって等価の増殖を誘導するため（それぞれ３．５ｕＬ及び２０ｕＬ）、かつより堅固な増殖を誘導するために（ＨＤ２０ｕＬ）選択された。試料は７日目に再刺激され、細胞内サイトカイン染色アッセイによってエフェクター機能を評価された。２０ｕＬのＨＤ試料（黒丸）、３．５ｕＬのＨＤ試料（黒く塗りつぶされた四角）、及び２０ｕＬのＬＤ試料（塗りつぶされていない四角）の全ては、ＣＤ１０７ａ及び（図３Ｃ）ＩＦＮγ産生によって測定された堅固で等価の用量依存的な（図３Ｂ）脱顆粒を誘導した。図３Ｄ、表面タンパク質ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの染色によって測定されたメモリエフェクター表現型。Ｔ細胞は、ナイーブ（ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＣＤ４４ｌｏ）、セントラルメモリ（ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＣＤ４４ｈｉ）、またはエフェクターメモリ（ＣＤ６２Ｌｌｏ、ＣＤ４４ｈｉ）に分類され得る。Ｅ）代表的なＦＡＣＳグラフはナノａＡＰＣ刺激の７日後に３つの集団を示す。図３Ｆ、Ｔ細胞は、２、１０、及び５０μＬのＬＤまたはＨＤ酸化鉄ナノａＡＰＣで刺激され、７日後に特性評価された。棒グラフは、刺激後に生成されたナイーブ（塗りつぶされていない）、Ｔｃｍ（灰色で塗りつぶされた）、及びＴｅｍ（黒色で塗りつぶされた）細胞の割合を示す。

【０００６】

【図４Ａ】内因性前駆体からの抗原特異的ヒトＴ細胞増殖。図４Ａ、ＰＢＭＣは、Ａ２－Ｍ１ＭＨＣ－Ｉｇを担持する漸増用量の鉄デキストランナノａＡＰＣとともにインキュベートされ、刺激の前（ＰＢＭＣ、上段列）または１週間（中間列）もしくは２週間（下段列）の刺激の後に、テトラマー染色によって抗原特異性を評価した。上段左の数は、テトラマー＋（ゲーティングした）であったＣＤ８＋細胞の割合を表す。Ｍ１特異的集団のサイズは、刺激の繰り返しのラウンド（上段～下段）及びナノａＡＰＣの漸増用量（左～右）とともに増加する。グラフは、パネルＢに要約された３つの別々の実験からの結果を代表する。図４Ｂ、ＣＤ８＋ＰＢＭＣ結合Ｍ１テトラマーの割合は繰り返し刺激及びナノａ

ＡＰＣの漸増用量（左パネル）とともに増加する。テトラマー陽性細胞（右パネル）の総数は、同様に、刺激のラウンド及び粒子用量とともに増加し、初期の前駆体集団の最大８００倍に増殖する。

【図４Ｂ】内因性前駆体からの抗原特異的ヒトＴ細胞増殖。図４Ａ、ＰＢＭＣは、Ａ２－Ｍ１ＭＨＣ－Ｉｇを担持する漸増用量の鉄デキストランナノａＡＰＣとともにインキュベートされ、刺激の前（ＰＢＭＣ、上段列）または１週間（中間列）もしくは２週間（下段列）の刺激の後に、テトラマー染色によって抗原特異性を評価した。上段左の数は、テトラマー＋（ゲーティングした）であったＣＤ８＋細胞の割合を表す。Ｍ１特異的集団のサイズは、刺激の繰り返しのラウンド（上段～下段）及びナノａＡＰＣの漸増用量（左～右）とともに増加する。グラフは、パネルＢに要約された３つの別々の実験からの結果を代表する。図４Ｂ、ＣＤ８＋ＰＢＭＣ結合Ｍ１テトラマーの割合は繰り返し刺激及びナノａＡＰＣの漸増用量（左パネル）とともに増加する。テトラマー陽性細胞（右パネル）の総数は、同様に、刺激のラウンド及び粒子用量とともに増加し、初期の前駆体集団の最大８００倍に増殖する。

【０００７】

【図５】量子ドットナノＡａｐｃの合成及び特性評価図。５Ａ、量子ドット（Ｑｄｏｔ）ナノａＡＰＣは、ポリマーコーティングされた量子ドット粒子の表面に対して１：１の比率における可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマー（シグナル１）及び抗ＣＤ２８抗体（シグナル２）のアビジン－ビオチン媒介結合によって構築された。図５Ｂ、全ＣＤ８＋Ｔ細胞における量子ドットナノａＡＰＣ増殖７日目の増殖倍率は用量依存的及び抗原特異的である。非同族粒子はいかなる増殖も誘導しなかったが、一方で、最高用量の同族量子ドットａＡＰＣはＣＴＬの１４．６倍の増殖を誘導した。

【０００８】

【図６】インビボのナノａＡＰＣ媒介腫瘍拒絶。図６Ａ、量子ドットａＡＰＣ。Ｂ１６腫瘍は、０日目に、同日のナイーブｐＭＥＬ　Ｔ細胞の注射とともに、皮下に注射された。１日後、量子ドットａＡＰＣは静脈内に（ｉｖ）注射された。腫瘍のサイズは、右に示される濃度曲線下面積（ＡＵＣ）を伴い、指示日数における表面積（$mm^2$）として測定された。ｐＭＥＬ　Ｔ細胞及び同族量子ドットａＡＰＣ（黒色棒）で処置されたマウスは、未処置（白色）、Ｔ細胞単独（淡い灰色）、及びＴ細胞＋非同族量子ドットａＡＰＣ（格子縞）と比較して、腫瘍があまり成長しなかった（１群当たり４匹のマウス）。重要性は、非同族量子ドットａＡＰＣと比較して、処置群のＡＵＣ（ｐ＜０．０２）によって、全実験にわたって特性評価された。図６Ｂ、鉄デキストランａＡＰＣ。ナイーブｐＭＥＬ　Ｔ細胞は－７日目に静脈内に注射された。１日後、量子ドットａＡＰＣは右脇腹の静脈内または皮下（ｓｃ）のいずれかに注射された。Ｂ１６腫瘍は０日目に右脇腹の皮下に注射された。処置アームにおけるマウスは、腫瘍注射後４日目に追加の注射、を静脈内または皮下のいずれかに与えられて、４つの処置群、非同族ａＡＰＣ静脈内（－６日目）次いで皮下（４日目）（格子縞）、同族ａＡＰＣ静脈内次いで静脈内（淡い灰色）、同族ａＡＰＣ静脈内次いで皮下（濃い灰色）、及び同族ａＡＰＣ皮下次いで皮下（黒色）を形成した。ｐＭＥＬ　Ｔ細胞及び同族鉄デキストランａＡＰＣ静脈内／皮下または皮下／皮下（塗りつぶされた四角）で処置されたマウスは、非同族ａＡＰＣと比較して腫瘍があまり成長しなかった（１群当たり７匹のマウス、＊ＡＵＣに対してｐ＜０．０１）。

【０００９】

【図７】ＣＦＳＥ、その強度がＴ細胞増殖後に低減する染料は、活性化細胞を含むＴ細胞集団（ＣＤ４４混合）が、６ｎｇのミクロａＡＰＣまたはナノａＡＰＣに基づく刺激に応じて、増殖するが、ナイーブＣＤ４４低細胞では増殖しないことを示す。図７Ｂ、ミクロａＡＰＣ及びナノａＡＰＣがＣＤ８＋（活性化）細胞における等倍の増殖（約１７倍）を誘導する用量へと滴定されるとき、ナノａＡＰＣはナイーブＴ細胞を増殖できない。

【００１０】

【図８－１】向上したＴ細胞活性化のための磁気濃縮方策の図解。低発生頻度前駆体細胞は対象の特異的抗原を担持するナノａＡＰＣに結合する。抗原特異的細胞は、その後の増

殖を向上させる正の磁気選択によって濃縮される。図８Ｂ。抗原特異的Ｔ細胞（ｙ軸）の発生頻度はナノａＡＰＣを使用する磁気濃縮によって向上される。図８Ｃ。濃縮後の７日間のナノａＡＰＣ媒介増殖後の抗原特異的細胞の発生頻度の増加。図８Ｄ。相補的な手法として、細胞は、ナノａＡＰＣに事前結合後、磁場において活性化される。磁場における培養は細胞増殖を上昇させる。図８Ｅ。活性化の３日後のＣＦＳＥ染色は１～３時間の活性化後に磁石が上昇を誘導したことを示す。図８Ｆ、これは活性化の７日後に測定された増殖の向上を引き起こし、磁気刺激は考えられる全ての用量で上昇を提供する。

【図８－２】向上したＴ細胞活性化のための磁気濃縮方策の図解。低発生頻度前駆体細胞は対象の特異的抗原を担持するナノａＡＰＣに結合する。抗原特異的細胞は、その後の増殖を向上させる正の磁気選択によって濃縮される。図８Ｂ。抗原特異的Ｔ細胞（ｙ軸）の発生頻度はナノａＡＰＣを使用する磁気濃縮によって向上される。図８Ｃ。濃縮後の７日間のナノａＡＰＣ媒介増殖後の抗原特異的細胞の発生頻度の増加。図８Ｄ。相補的な手法として、細胞は、ナノａＡＰＣに事前結合後、磁場において活性化される。磁場における培養は細胞増殖を上昇させる。図８Ｅ。活性化の３日後のＣＦＳＥ染色は１～３時間の活性化後に磁石が上昇を誘導したことを示す。図８Ｆ、これは活性化の７日後に測定された増殖の向上を引き起こし、磁気刺激は考えられる全ての用量で上昇を提供する。

【００１１】

【図９－１】ナノａＡＰＣはナイーブ及び活性化細胞に結合する。図９Ａ、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び共刺激抗ＣＤ２８を鉄デキストランナノ粒子に結合することによるナノａＡＰＣ合成の図解。図９Ｂ、８ｎｇのＤｂ－ＧＰ１００を提示するナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ＣＦＳＥ希釈によって測定されたナイーブ（左）及び活性化（右）ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖。灰色の無刺激対照。図９Ｃ、ナノａＡＰＣ刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖倍率。８ｎｇ以下のＭＨＣ－Ｉｇを提示するナノａＡＰＣは、活性化Ｔ細胞と比較してナイーブ細胞（＊、ｐ＜０．０１）の最小増殖を誘導した。図９Ｄ、２Ｃ　Ｔ細胞（対応スチューデントｔ検定によって有意に異なるｐ＜０．０２半減期）に結合したＫｂ－ＳＩＹナノ粒子の解離。表１を参照されたい。図９Ｅ、解離データから推定される、ナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞でのＫｂ－ＳＩＹダイマー（ＭＨＣ－Ｉｇ）とＫｂ－ＳＩＹナノ粒子（粒子）との間でなされた平均ＴＣＲ－ＭＨＣ接触（テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ’ｓ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０５、表１参照）。図９Ｆ、漸増用量のナノａＡＰＣ（提示された合計ＭＨＣ－Ｉｇによって測定）のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞との平衡結合（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）。図９Ｇ、増加した平衡結合及び粒子オフレートを説明する結合モデル、ナイーブ細胞は活性化細胞よりも１ビーズ当たりより少ない接触を伴い、より多くのビーズと結合する。

【図９－２】ナノａＡＰＣはナイーブ及び活性化細胞に結合する。図９Ａ、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び共刺激抗ＣＤ２８を鉄デキストランナノ粒子に結合することによるナノａＡＰＣ合成の図解。図９Ｂ、８ｎｇのＤｂ－ＧＰ１００を提示するナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ＣＦＳＥ希釈によって測定されたナイーブ（左）及び活性化（右）ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖。灰色の無刺激対照。図９Ｃ、ナノａＡＰＣ刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖倍率。８ｎｇ以下のＭＨＣ－Ｉｇを提示するナノａＡＰＣは、活性化Ｔ細胞と比較してナイーブ細胞（＊、ｐ＜０．０１）の最小増殖を誘導した。図９Ｄ、２Ｃ　Ｔ細胞（対応スチューデントｔ検定によって有意に異なるｐ＜０．０２半減期）に結合したＫｂ－ＳＩＹナノ粒子の解離。表１を参照されたい。図９Ｅ、解離データから推定される、ナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞でのＫｂ－ＳＩＹダイマー（ＭＨＣ－Ｉｇ）とＫｂ－ＳＩＹナノ粒子（粒子）との間でなされた平均ＴＣＲ－ＭＨＣ接触（テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ’ｓ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０５、表１参照）。図９Ｆ、漸増用量のナノａＡＰＣ（提示された合計ＭＨＣ－Ｉｇによって測定）のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞との平衡結合（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）。図９Ｇ、増加した平衡結合及び粒子オフレートを説明する結合モデル、ナイーブ細胞は活性化細胞よりも１ビーズ当たりより少な

い接触を伴い、より多くのビーズと結合する。
【図９－３】ナノａＡＰＣはナイーブ及び活性化細胞に結合する。図９Ａ、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び共刺激抗ＣＤ２８を鉄デキストランナノ粒子に結合することによるナノａＡＰＣ合成の図解。図９Ｂ、８ｎｇのＤｂ－ＧＰ１００を提示するナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ＣＦＳＥ希釈によって測定されたナイーブ（左）及び活性化（右）ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖。灰色の無刺激対照。図９Ｃ、ナノａＡＰＣ刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖倍率。８ｎｇ以下のＭＨＣ－Ｉｇを提示するナノａＡＰＣは、活性化Ｔ細胞と比較してナイーブ細胞（＊、ｐ＜０．０１）の最小増殖を誘導した。図９Ｄ、２Ｃ　Ｔ細胞（対応スチューデントｔ検定によって有意に異なるｐ＜０．０２半減期）に結合したＫｂ－ＳＩＹナノ粒子の解離。表１を参照されたい。図９Ｅ、解離データから推定される、ナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞でのＫｂ－ＳＩＹダイマー（ＭＨＣ－Ｉｇ）とＫｂ－ＳＩＹナノ粒子（粒子）との間でなされた平均ＴＣＲ－ＭＨＣ接触（テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ’ｓ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０５、表１参照）。図９Ｆ、漸増用量のナノａＡＰＣ（提示された合計ＭＨＣ－Ｉｇによって測定）のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞との平衡結合（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）。図９Ｇ、増加した平衡結合及び粒子オフレートを説明する結合モデル、ナイーブ細胞は活性化細胞よりも１ビーズ当たりより少ない接触を伴い、より多くのビーズと結合する。
【図９－４】ナノａＡＰＣはナイーブ及び活性化細胞に結合する。図９Ａ、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び共刺激抗ＣＤ２８を鉄デキストランナノ粒子に結合することによるナノａＡＰＣ合成の図解。図９Ｂ、８ｎｇのＤｂ－ＧＰ１００を提示するナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ＣＦＳＥ希釈によって測定されたナイーブ（左）及び活性化（右）ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖。灰色の無刺激対照。図９Ｃ、ナノａＡＰＣ刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖倍率。８ｎｇ以下のＭＨＣ－Ｉｇを提示するナノａＡＰＣは、活性化Ｔ細胞と比較してナイーブ細胞（＊、ｐ＜０．０１）の最小増殖を誘導した。図９Ｄ、２Ｃ　Ｔ細胞（対応スチューデントｔ検定によって有意に異なるｐ＜０．０２半減期）に結合したＫｂ－ＳＩＹナノ粒子の解離。表１を参照されたい。図９Ｅ、解離データから推定される、ナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞でのＫｂ－ＳＩＹダイマー（ＭＨＣ－Ｉｇ）とＫｂ－ＳＩＹナノ粒子（粒子）との間でなされた平均ＴＣＲ－ＭＨＣ接触（テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ’ｓ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０５、表１参照）。図９Ｆ、漸増用量のナノａＡＰＣ（提示された合計ＭＨＣ－Ｉｇによって測定）のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞との平衡結合（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）。図９Ｇ、増加した平衡結合及び粒子オフレートを説明する結合モデル、ナイーブ細胞は活性化細胞よりも１ビーズ当たりより少ない接触を伴い、より多くのビーズと結合する。
【図９－５】ナノａＡＰＣはナイーブ及び活性化細胞に結合する。図９Ａ、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び共刺激抗ＣＤ２８を鉄デキストランナノ粒子に結合することによるナノａＡＰＣ合成の図解。図９Ｂ、８ｎｇのＤｂ－ＧＰ１００を提示するナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ＣＦＳＥ希釈によって測定されたナイーブ（左）及び活性化（右）ｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖。灰色の無刺激対照。図９Ｃ、ナノａＡＰＣ刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖倍率。８ｎｇ以下のＭＨＣ－Ｉｇを提示するナノａＡＰＣは、活性化Ｔ細胞と比較してナイーブ細胞（＊、ｐ＜０．０１）の最小増殖を誘導した。図９Ｄ、２Ｃ　Ｔ細胞（対応スチューデントｔ検定によって有意に異なるｐ＜０．０２半減期）に結合したＫｂ－ＳＩＹナノ粒子の解離。表１を参照されたい。図９Ｅ、解離データから推定される、ナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞でのＫｂ－ＳＩＹダイマー（ＭＨＣ－Ｉｇ）とＫｂ－ＳＩＹナノ粒子（粒子）との間でなされた平均ＴＣＲ－ＭＨＣ接触（テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ’ｓ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０５、表１参照）。図９Ｆ、漸増用量のナノａＡＰＣ（提示された合計ＭＨＣ－Ｉｇによって測定）のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞との平衡結合（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）。図９Ｇ、増加した平衡結合及び粒子オフ

レートを説明する結合モデル、ナイーブ細胞は活性化細胞よりも１ビーズ当たりより少ない接触を伴い、より多くのビーズと結合する。

【００１２】

【図１０－１】磁場によって誘導されるａＡＰＣ及びＣＤ３εのクラスタ形成。図１０Ａ～Ｃ、磁石誘導されたクラスタ形成の図解。図１０Ｄ、ナノａＡＰＣ結合（時間０）の直後及び磁場の存在または不在下でのインキュベーション後のａＡＰＣ及びＣＤ３凝集細胞は、ＬＦＡ－１（緑色）、ナノａＡＰＣ上のＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）、及びＣＤ３ε（深紅色）に対する抗体で標識された。代表的な画像は、インキュベーションより前の細胞（時間０、上段左）、非同族粒子とともにインキュベートされた細胞（非同族、上段右）、同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石無し、下段左）、及び磁場において同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石、下段右）に対して示される。図１０Ｅ、時間０群（左の２つ）及び磁石群（右の２つ）からの代表的な画像に対して示された凝集検出。白色の輪郭は、アルゴリズムによって特定されるＣＤ３クラスタ（深紅色）の境界線を表す。図１０Ｆ、クラスタ検出アルゴリズムで特定された平均クラスタ領域（１５細胞／群）。磁石無しの群は時間０より有意に大きなクラスタを有し（＊、平均差０．２２μｍ$^2$）、磁石群は、時間０（＊＊、平均差０．４６μｍ$^2$、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）及び磁石無し（＊＊、平均差０．２４μｍ$^2$）の両方より有意に大きなクラスタを有した。図１０Ｇ、磁石無しの群の細胞は、時間０（＊、平均差５．８クラスタ）より細胞当たり少ないクラスタを有し、磁石群細胞は、磁石無し（＊＊、平均差１．９クラスタ、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）より細胞当たり少ないクラスタを有した。

【図１０－２】磁場によって誘導されるａＡＰＣ及びＣＤ３εのクラスタ形成。図１０Ａ～Ｃ、磁石誘導されたクラスタ形成の図解。図１０Ｄ、ナノａＡＰＣ結合（時間０）の直後及び磁場の存在または不在下でのインキュベーション後のａＡＰＣ及びＣＤ３凝集細胞は、ＬＦＡ－１（緑色）、ナノａＡＰＣ上のＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）、及びＣＤ３ε（深紅色）に対する抗体で標識された。代表的な画像は、インキュベーションより前の細胞（時間０、上段左）、非同族粒子とともにインキュベートされた細胞（非同族、上段右）、同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石無し、下段左）、及び磁場において同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石、下段右）に対して示される。図１０Ｅ、時間０群（左の２つ）及び磁石群（右の２つ）からの代表的な画像に対して示された凝集検出。白色の輪郭は、アルゴリズムによって特定されるＣＤ３クラスタ（深紅色）の境界線を表す。図１０Ｆ、クラスタ検出アルゴリズムで特定された平均クラスタ領域（１５細胞／群）。磁石無しの群は時間０より有意に大きなクラスタを有し（＊、平均差０．２２μｍ$^2$）、磁石群は、時間０（＊＊、平均差０．４６μｍ$^2$、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）及び磁石無し（＊＊、平均差０．２４μｍ$^2$）の両方より有意に大きなクラスタを有した。図１０Ｇ、磁石無しの群の細胞は、時間０（＊、平均差５．８クラスタ）より細胞当たり少ないクラスタを有し、磁石群細胞は、磁石無し（＊＊、平均差１．９クラスタ、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）より細胞当たり少ないクラスタを有した。

【図１０－３】磁場によって誘導されるａＡＰＣ及びＣＤ３εのクラスタ形成。図１０Ａ～Ｃ、磁石誘導されたクラスタ形成の図解。図１０Ｄ、ナノａＡＰＣ結合（時間０）の直後及び磁場の存在または不在下でのインキュベーション後のａＡＰＣ及びＣＤ３凝集細胞は、ＬＦＡ－１（緑色）、ナノａＡＰＣ上のＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）、及びＣＤ３ε（深紅色）に対する抗体で標識された。代表的な画像は、インキュベーションより前の細胞（時間０、上段左）、非同族粒子とともにインキュベートされた細胞（非同族、上段右）、同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石無し、下段左）、及び磁場において同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石、下段右）に対して示される。図１０Ｅ、時間０群（左の２つ）及び磁石群（右の２つ）からの代表的な画像に対

して示された凝集検出。白色の輪郭は、アルゴリズムによって特定されるＣＤ３クラスタ（深紅色）の境界線を表す。図１０Ｆ、クラスタ検出アルゴリズムで特定された平均クラスタ領域（１５細胞／群）。磁石無しの群は時間０より有意に大きなクラスタを有し（＊、平均差０．２２μｍ$^2$）、磁石群は、時間０（＊＊、平均差０．４６μｍ$^2$、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．０００１）及び磁石無し（＊＊、平均差０．２４μｍ$^2$）の両方より有意に大きなクラスタを有した。図１０Ｇ、磁石無しの群の細胞は、時間０（＊、平均差５．８クラスタ）より細胞当たり少ないクラスタを有し、磁石群細胞は、磁石無し（＊＊、平均差１．９クラスタ、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）より細胞当たり少ないクラスタを有した。

【００１３】

【図１１－１】磁石向上ナノａＡＰＣ刺激はインビトロの堅固なＴ細胞増殖を引き起こす。図１１Ａ、０．２Ｔ外部磁場の存在（赤色）または不在（黒色）下での、ナノａＡＰＣでの刺激の３日後のＣＦＳＥ希釈によるＰｍｅｌ　Ｔ細胞増殖。図１１Ｂ、刺激の７日後に記載された試料の増殖倍率。図１１Ｃ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び０～２４時間の０．２Ｔ磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。３日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１１Ｄ、刺激の７日後のＣからの試料の増殖倍率。（＊、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）図１１Ｅ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び２４時間の増加する厚さのネオジム磁石によって作り出された増加する最大強度（０．１５～０．２２５Ｔ）の磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。図１１Ｆ、刺激の７日後のＥからの試料増殖（＊磁石無しよりも多い、＊＊０．１５Ｔ磁石より多い、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）。図１１Ｇ、２４時間の０．２Ｔ磁場の存在または不在下での、Ｋｂ－Ｔｒｐ２ナノａＡＰＣでの刺激後の野生型マウスからの内因性ＣＤ８＋リンパ球の抗原特異的増殖。７日後、集団は同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２（上段列）または非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ（下段列）ＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色された。

【図１１－２】磁石向上ナノａＡＰＣ刺激はインビトロの堅固なＴ細胞増殖を引き起こす。図１１Ａ、０．２Ｔ外部磁場の存在（赤色）または不在（黒色）下での、ナノａＡＰＣでの刺激の３日後のＣＦＳＥ希釈によるＰｍｅｌ　Ｔ細胞増殖。図１１Ｂ、刺激の７日後に記載された試料の増殖倍率。図１１Ｃ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び０～２４時間の０．２Ｔ磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。３日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１１Ｄ、刺激の７日後のＣからの試料の増殖倍率。（＊、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）図１１Ｅ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び２４時間の増加する厚さのネオジム磁石によって作り出された増加する最大強度（０．１５～０．２２５Ｔ）の磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。図１１Ｆ、刺激の７日後のＥからの試料増殖（＊磁石無しよりも多い、＊＊０．１５Ｔ磁石より多い、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）。図１１Ｇ、２４時間の０．２Ｔ磁場の存在または不在下での、Ｋｂ－Ｔｒｐ２ナノａＡＰＣでの刺激後の野生型マウスからの内因性ＣＤ８＋リンパ球の抗原特異的増殖。７日後、集団は同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２（上段列）または非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ（下段列）ＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色された。

【図１１－３】磁石向上ナノａＡＰＣ刺激はインビトロの堅固なＴ細胞増殖を引き起こす。図１１Ａ、０．２Ｔ外部磁場の存在（赤色）または不在（黒色）下での、ナノａＡＰＣでの刺激の３日後のＣＦＳＥ希釈によるＰｍｅｌ　Ｔ細胞増殖。図１１Ｂ、刺激の７日後に記載された試料の増殖倍率。図１１Ｃ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び０～２４時間の０．２Ｔ磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。３日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１１Ｄ、刺激の７日後のＣからの試料の増殖倍率。（＊、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶ

Ａによってｐ＜０．００１）図１１Ｅ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び２４時間の増加する厚さのネオジム磁石によって作り出された増加する最大強度（０．１５～０．２２５Ｔ）の磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。図１１Ｆ、刺激の７日後のＥからの試料増殖（＊磁石無しよりも多い、＊＊０．１５Ｔ磁石より多い、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）。図１１Ｇ、２４時間の０．２Ｔ磁場の存在または不在下での、Ｋｂ－Ｔｒｐ２ナノａＡＰＣでの刺激後の野生型マウスからの内因性ＣＤ８＋リンパ球の抗原特異的増殖。７日後、集団は同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２（上段列）または非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ（下段列）ＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色された。

【図１１－４】磁石向上ナノａＡＰＣ刺激はインビトロの堅固なＴ細胞増殖を引き起こす。図１１Ａ、０．２Ｔ外部磁場の存在（赤色）または不在（黒色）下での、ナノａＡＰＣでの刺激の３日後のＣＦＳＥ希釈によるＰｍｅｌ　Ｔ細胞増殖。図１１Ｂ、刺激の７日後に記載された試料の増殖倍率。図１１Ｃ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び０～２４時間の０．２Ｔ磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。３日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１１Ｄ、刺激の７日後のＣからの試料の増殖倍率。（＊、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）図１１Ｅ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び２４時間の増加する厚さのネオジム磁石によって作り出された増加する最大強度（０．１５～０．２２５Ｔ）の磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。図１１Ｆ、刺激の７日後のＥからの試料増殖（＊磁石無しよりも多い、＊＊０．１５Ｔ磁石より多い、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）。図１１Ｇ、２４時間の０．２Ｔ磁場の存在または不在下での、Ｋｂ－Ｔｒｐ２ナノａＡＰＣでの刺激後の野生型マウスからの内因性ＣＤ８＋リンパ球の抗原特異的増殖。７日後、集団は同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２（上段列）または非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ（下段列）ＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色された。

【図１１－５】磁石向上ナノａＡＰＣ刺激はインビトロの堅固なＴ細胞増殖を引き起こす。図１１Ａ、０．２Ｔ外部磁場の存在（赤色）または不在（黒色）下での、ナノａＡＰＣでの刺激の３日後のＣＦＳＥ希釈によるＰｍｅｌ　Ｔ細胞増殖。図１１Ｂ、刺激の７日後に記載された試料の増殖倍率。図１１Ｃ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び０～２４時間の０．２Ｔ磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。３日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１１Ｄ、刺激の７日後のＣからの試料の増殖倍率。（＊、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）図１１Ｅ、５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ用量のナノａＡＰＣ及び２４時間の増加する厚さのネオジム磁石によって作り出された増加する最大強度（０．１５～０．２２５Ｔ）の磁場とともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。図１１Ｆ、刺激の７日後のＥからの試料増殖（＊磁石無しよりも多い、＊＊０．１５Ｔ磁石より多い、テューキーの事後検定（Ｔｕｋｅｙ　ｐｏｓｔ－ｔｅｓｔ）を用いたＡＮＯＶＡによってｐ＜０．００１）。図１１Ｇ、２４時間の０．２Ｔ磁場の存在または不在下での、Ｋｂ－Ｔｒｐ２ナノａＡＰＣでの刺激後の野生型マウスからの内因性ＣＤ８＋リンパ球の抗原特異的増殖。７日後、集団は同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２（上段列）または非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ（下段列）ＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色された。

【００１４】

【図１２Ａ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激さ

れた（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【図１２Ｂ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激された（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【図１２Ｃ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激された（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び

２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【図１２Ｄ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激された（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【図１２Ｅ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激された（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチ

ューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【図１２Ｆ】インビボの磁石向上Ｔ細胞増殖及び養子免疫治療の増加した効力。図１２Ａ、養子免疫治療モデルの図解。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　ＴＣＲトランスジェニックマウスからのＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、野生型Ｔｈｙ１．２＋Ｂ６レシピエントマウスに養子移植されるより前に、ナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）及び磁場の存在または不在下で、２４時間、インビトロで刺激された（１群当たり６匹のマウス）。図１２Ｂ、移植の７日後の脾臓及び移植の２１日後の日中リンパ節からのＴｈｙ１．１細胞の代表的な発生頻度。図１２Ｃ、Ｔｈｙ１．１＋細胞の発生頻度は、磁石無しを伴うナノａＡＰＣ（灰色）及び刺激無し（白色）と比較して、磁場においてナノａＡＰＣで刺激された（赤色）Ｔ細胞を与えられたマウスにおいて有意に高かった（７日目及び２１日目に対する二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．００１）。図１２Ｄ、７日目及び２１日目の組み合わされた全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞。７日目のナノａＡＰＣ単独群よりも５倍多い細胞が、ナノａＡＰＣ＋磁石群において観察されたが（スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０５）、２１日目に有意に達しなかった（ｐ＝０．１５）。図１２Ｅ、磁場向上養子免疫治療での確立された腫瘍の処置の図解。ＳＣ腫瘍は、０日目に投与され、９日目に部分的骨髄破壊、及び磁場（赤色）におけるナノａＡＰＣ（５ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）または磁石無し（黒色）を伴うナノａＡＰＣのいずれかで２４時間刺激されたＣＤ４４１ｏ、ＣＤ８＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞は１０日目に移植された。Ｔ細胞単独（灰色）及び未処置（空白）群は対照として使用された（１群当たり８匹のマウス）。図１２Ｆ、磁石向上ナノａＡＰＣ活性化Ｔ細胞での処置は、磁石無し及び対照群と比較して腫瘍成長を減弱させた（二元ＡＮＯＶＡによる処置効果に対してｐ＜０．０００１）。矢印は養子移植の時点を示す（１０日目）。マウスは、死亡した場合かまたは腫瘍が１５０ｍｍ$^2$を超える場合、検閲された。処置は、Ｔ細胞＋ナノａＡＰＣ＋磁石群における生存の増加をもたらした（マンテル－コックスログランク検定によってｐ＜０．００１）。

【００１５】

【図１３－１】蛍光によるナノ及びミクロａＡＰＣに結合したタンパク質の特性評価図。１３Ａ、ナノ粒子及び対照に結合した抗体の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。ナノａＡＰＣ及びマクロａＡＰＣ（細胞のサイズの）粒子は、過剰のモノクローナル抗マウスＩｇＧ１（ＭＨＣ－Ｉｇに対して）及び３０分間ＰＥで共役され、かつ磁気カラム上で洗浄された抗抗体とともにインキュベートされた。粒子に結合した蛍光抗体は、抗ＩｇＧ１（Ａｂ無し）で染色されていないミクロ及びナノ粒子ならびにタンパク質に結合されておらず、抗ＩｇＧ１で染色された粒子（ブランク）を含むバックグラウンド試料を超えて検出可能であった。溶液中のタンパク質濃度はＩｇＧ１－ＰＥ標準曲線と比較することによって判定された。蛍光は抗ＩｇＧ１のために示され、３つの実験を代表する。ＨＤ－高密度。ＬＤ－低密度。図１３Ｂ、溶液中の粒子は抗体蛍光に干渉しない。可溶性抗ＩｇＧ１ＰＥ抗体は蛍光のために滴定及び測定された。同様の蛍光発光は、可溶性抗体がブランクミクロ及びナノ粒子の存在下で測定されたときに観察された。図１３Ｃ、磁気カラム中での洗浄は遊離抗体を除去するのに十分であった。３回の洗浄後（画分３）、蛍光はバックグラウンドを

超えて検出可能ではない。０．６３ｕｇ／ｍｌの遊離抗体の蛍光が比較のため提供される。図１３Ｄ、ナノ粒子濃度は４０５ｎｍでの鉄吸収度を特徴とした。粒子濃度はナノ粒子トラッキング分析によって判定された。ナノ粒子の滴定は吸収度のために測定され、標準曲線を計算して粒子濃度を判定した。

【図１３－２】蛍光によるナノ及びミクロａＡＰＣに結合したタンパク質の特性評価図。１３Ａ、ナノ粒子及び対照に結合した抗体の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。ナノａＡＰＣ及びマクロａＡＰＣ（細胞のサイズの）粒子は、過剰のモノクローナル抗マウスＩｇＧ１（ＭＨＣ－Ｉｇに対して）及び３０分間ＰＥで共役され、かつ磁気カラム上で洗浄された抗抗体とともにインキュベートされた。粒子に結合した蛍光抗体は、抗ＩｇＧ１（Ａｂ無し）で染色されていないミクロ及びナノ粒子ならびにタンパク質に結合されておらず、抗ＩｇＧ１で染色された粒子（ブランク）を含むバックグラウンド試料を超えて検出可能であった。溶液中のタンパク質濃度はＩｇＧ１－ＰＥ標準曲線と比較することによって判定された。蛍光は抗ＩｇＧ１のために示され、３つの実験を代表する。ＨＤ－高密度。ＬＤ－低密度。図１３Ｂ、溶液中の粒子は抗体蛍光に干渉しない。可溶性抗ＩｇＧ１ＰＥ抗体は蛍光のために滴定及び測定された。同様の蛍光発光は、可溶性抗体がブランクミクロ及びナノ粒子の存在下で測定されたときに観察された。図１３Ｃ、磁気カラム中での洗浄は遊離抗体を除去するのに十分であった。３回の洗浄後（画分３）、蛍光はバックグラウンドを超えて検出可能ではない。０．６３ｕｇ／ｍｌの遊離抗体の蛍光が比較のため提供される。図１３Ｄ、ナノ粒子濃度は４０５ｎｍでの鉄吸収度を特徴とした。粒子濃度はナノ粒子トラッキング分析によって判定された。ナノ粒子の滴定は吸収度のために測定され、標準曲線を計算して粒子濃度を判定した。

【００１６】

【図１４－１】ミクロａＡＰＣによって誘導されたｐＭＥＬ　Ｔ細胞増殖。図１４Ａ、ＣＤ８＋ｐＭＥＬ脾細胞は、メモリ表現型ＣＤ４４陽性細胞の集団を含む（ＣＤ８の割合として示された代表的な割合、左）。ＣＤ４４ｌｏナイーブ細胞は、磁気濃縮カラム中の抗ＣＤ４４抗体を伴い、ノータッチの負の選択濃縮によって単離された。図１４Ｂ、ミクロａＡＰＣ（濃い赤色及び青色の線）及びナノａＡＰＣ（淡い赤色及び青色の線）で３日刺激されたか、または刺激されていない（灰色の線）ＣＦＳＥ希釈によるナイーブＣＤ４４ｌｏ（左）及び活性化（右）細胞の増殖。ミクロ及びナノａＡＰＣは等価の総量のＭＨＣ－Ｉｇ（８ｎｇ）を提示する用量で使用された。ナノａＡＰＣデータは図１から再現される。図１４Ｃ、指示用量のミクロａＡＰＣでの刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖。図１４Ｄ、ＭＨＣ－Ｉｇ密度のミクロａＡＰＣ誘導刺激に対する影響抗密度（ＨＤ、青色）及び低密度（ＬＤ、赤色）ミクロａＡＰＣは合計ＭＨＣ－Ｉｇ（４～１６ｎｇ）のために正規化された。密度のために表１を参照されたい。活性化の３日後のＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１４Ｅ、活性化の７日後の図１４Ｄに示される試料の増殖倍率、３つの実験の代表。

【図１４－２】ミクロａＡＰＣによって誘導されたｐＭＥＬ　Ｔ細胞増殖。図１４Ａ、ＣＤ８＋ｐＭＥＬ脾細胞は、メモリ表現型ＣＤ４４陽性細胞の集団を含む（ＣＤ８の割合として示された代表的な割合、左）。ＣＤ４４ｌｏナイーブ細胞は、磁気濃縮カラム中の抗ＣＤ４４抗体を伴い、ノータッチの負の選択濃縮によって単離された。図１４Ｂ、ミクロａＡＰＣ（濃い赤色及び青色の線）及びナノａＡＰＣ（淡い赤色及び青色の線）で３日刺激されたか、または刺激されていない（灰色の線）ＣＦＳＥ希釈によるナイーブＣＤ４４ｌｏ（左）及び活性化（右）細胞の増殖。ミクロ及びナノａＡＰＣは等価の総量のＭＨＣ－Ｉｇ（８ｎｇ）を提示する用量で使用された。ナノａＡＰＣデータは図１から再現される。図１４Ｃ、指示用量のミクロａＡＰＣでの刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖。図１４Ｄ、ＭＨＣ－Ｉｇ密度のミクロａＡＰＣ誘導刺激に対する影響抗密度（ＨＤ、青色）及び低密度（ＬＤ、赤色）ミクロａＡＰＣは合計ＭＨＣ－Ｉｇ（４～１６ｎｇ）のために正規化された。密度のために表１を参照されたい。活性化の３日後のＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１４Ｅ、活性化の７日後の図１４Ｄに示される試料の増殖倍率、３つの実験の代表。

【図１４－３】ミクロａＡＰＣによって誘導されたｐＭＥＬ　Ｔ細胞増殖。図１４Ａ、ＣＤ８＋ｐＭＥＬ脾細胞は、メモリ表現型ＣＤ４４陽性細胞の集団を含む（ＣＤ８の割合として示された代表的な割合、左）。ＣＤ４４ｌｏナイーブ細胞は、磁気濃縮カラム中の抗ＣＤ４４抗体を伴い、ノータッチの負の選択濃縮によって単離された。図１４Ｂ、ミクロａＡＰＣ（濃い赤色及び青色の線）及びナノａＡＰＣ（淡い赤色及び青色の線）で３日刺激されたか、または刺激されていない（灰色の線）ＣＦＳＥ希釈によるナイーブＣＤ４４ｌｏ（左）及び活性化（右）細胞の増殖。ミクロ及びナノａＡＰＣは等価の総量のＭＨＣ－Ｉｇ（８ｎｇ）を提示する用量で使用された。ナノａＡＰＣデータは図１から再現される。図１４Ｃ、指示用量のミクロａＡＰＣでの刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖。図１４Ｄ、ＭＨＣ－Ｉｇ密度のミクロａＡＰＣ誘導刺激に対する影響抗密度（ＨＤ、青色）及び低密度（ＬＤ、赤色）ミクロａＡＰＣは合計ＭＨＣ－Ｉｇ（４～１６ｎｇ）のために正規化された。密度のために表１を参照されたい。活性化の３日後のＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１４Ｅ、活性化の７日後の図１４Ｄに示される試料の増殖倍率、３つの実験の代表。

【図１４－４】ミクロａＡＰＣによって誘導されたｐＭＥＬ　Ｔ細胞増殖。図１４Ａ、ＣＤ８＋ｐＭＥＬ脾細胞は、メモリ表現型ＣＤ４４陽性細胞の集団を含む（ＣＤ８の割合として示された代表的な割合、左）。ＣＤ４４ｌｏナイーブ細胞は、磁気濃縮カラム中の抗ＣＤ４４抗体を伴い、ノータッチの負の選択濃縮によって単離された。図１４Ｂ、ミクロａＡＰＣ（濃い赤色及び青色の線）及びナノａＡＰＣ（淡い赤色及び青色の線）で３日刺激されたか、または刺激されていない（灰色の線）ＣＦＳＥ希釈によるナイーブＣＤ４４ｌｏ（左）及び活性化（右）細胞の増殖。ミクロ及びナノａＡＰＣは等価の総量のＭＨＣ－Ｉｇ（８ｎｇ）を提示する用量で使用された。ナノａＡＰＣデータは図１から再現される。図１４Ｃ、指示用量のミクロａＡＰＣでの刺激の７日後のナイーブ（赤色）及び活性化（青色）細胞の増殖。図１４Ｄ、ＭＨＣ－Ｉｇ密度のミクロａＡＰＣ誘導刺激に対する影響抗密度（ＨＤ、青色）及び低密度（ＬＤ、赤色）ミクロａＡＰＣは合計ＭＨＣ－Ｉｇ（４～１６ｎｇ）のために正規化された。密度のために表１を参照されたい。活性化の３日後のＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１４Ｅ、活性化の７日後の図１４Ｄに示される試料の増殖倍率、３つの実験の代表。

【００１７】

【図１５－１】図１５Ａ、同族２Ｃ　Ｔ細胞に結合しているＫｂ－ＳＩＹナノ粒子。ナイーブＣＤ４４ｌｏ単離２Ｃ　Ｔ細胞（ナイーブ、赤色、ＭＦＩ１７９）及び対照非同族ＣＤ４４ｌｏ　ｐｍｅｌ　Ｔ細胞（非特異的結合、灰色、ＭＦＩ２１）と比較して、ペプチド活性化の７日後（活性化、青色、ＭＦＩ８９）、活性化細胞に結合すること。結合は細胞に結合したＡｌｅｘａ６４７標識された粒子の平均蛍光強度として特性評価される。図１５Ｂ、蛍光抗ＴＣＲβで測定されたナイーブ（ＭＦＩ１３７）及び活性化（ＭＦＩ１２８）細胞の表面ＴＣＲ発現。図１５Ｃ、活性化（濃い青色）及びナイーブ（濃い赤色）細胞からのＫｂ－ＳＩＹ　ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの解離。活性化（淡い青色）及びナイーブ（淡い赤色）細胞からのナノａＡＰＣの解離は比較のため、図１から再現される。図１５Ｄ、磁場における１時間のインキュベーションの前（赤色）及び後（黒色）にナイーブＣＤ４４低細胞に結合されたナノａＡＰＣの解離曲線。図は、２つの実験を代表する。

【図１５－２】図１５Ａ、同族２Ｃ　Ｔ細胞に結合しているＫｂ－ＳＩＹナノ粒子。ナイーブＣＤ４４ｌｏ単離２Ｃ　Ｔ細胞（ナイーブ、赤色、ＭＦＩ１７９）及び対照非同族ＣＤ４４ｌｏ　ｐｍｅｌ　Ｔ細胞（非特異的結合、灰色、ＭＦＩ２１）と比較して、ペプチド活性化の７日後（活性化、青色、ＭＦＩ８９）、活性化細胞に結合すること。結合は細胞に結合したＡｌｅｘａ６４７標識された粒子の平均蛍光強度として特性評価される。図１５Ｂ、蛍光抗ＴＣＲβで測定されたナイーブ（ＭＦＩ１３７）及び活性化（ＭＦＩ１２８）細胞の表面ＴＣＲ発現。図１５Ｃ、活性化（濃い青色）及びナイーブ（濃い赤色）細胞からのＫｂ－ＳＩＹ　ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの解離。活性化（淡い青色）及びナイーブ（淡い赤色）細胞からのナノａＡＰＣの解離は比較のため、図１から再現される。図１５Ｄ、磁場における１時間のインキュベーションの前（赤色）及び後（黒色）にナイーブＣ

Ｄ４４低細胞に結合されたナノａＡＰＣの解離曲線。図は、２つの実験を代表する。
【図１５－３】図１５Ａ、同族２Ｃ　Ｔ細胞に結合しているＫｂ－ＳＩＹナノ粒子。ナイーブＣＤ４４ｌｏ単離２Ｃ　Ｔ細胞（ナイーブ、赤色、ＭＦＩ１７９）及び対照非同族ＣＤ４４ｌｏ　ｐｍｅｌ　Ｔ細胞（非特異的結合、灰色、ＭＦＩ２１）と比較して、ペプチド活性化の７日後（活性化、青色、ＭＦＩ８９）、活性化細胞に結合すること。結合は細胞に結合したＡｌｅｘａ６４７標識された粒子の平均蛍光強度として特性評価される。図１５Ｂ、蛍光抗ＴＣＲβで測定されたナイーブ（ＭＦＩ１３７）及び活性化（ＭＦＩ１２８）細胞の表面ＴＣＲ発現。図１５Ｃ、活性化（濃い青色）及びナイーブ（濃い赤色）細胞からのＫｂ－ＳＩＹ　ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの解離。活性化（淡い青色）及びナイーブ（淡い赤色）細胞からのナノａＡＰＣの解離は比較のため、図１から再現される。図１５Ｄ、磁場における１時間のインキュベーションの前（赤色）及び後（黒色）にナイーブＣＤ４４低細胞に結合されたナノａＡＰＣの解離曲線。図は、２つの実験を代表する。
【００１８】
【図１６－１】磁場におけるミクロａＡＰＣによるＴＣＲクラスタ形成及び増殖。図１６Ａ、磁場におけるミクロａＡＰＣ凝集。磁場の適用の前（左）及び後（右）に示されるミクロａＡＰＣ（赤色）の代表的な共焦点像。図１６Ｂ、ミクロａＡＰＣ磁気凝集はＣＤ３凝集を誘導しない。細胞は、ＬＦＡ－１（緑色）、ミクロａＡＰＣ上のＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）、及びＣＤ３ε（深紅色）に対する抗体で標識された。ミクロａＡＰＣは全ての３つのチャネルにおいて、特に赤色及び深紅色チャネルにおいて、自己蛍光を示した。代表的な画像は、両方ミクロａＡＰＣと接触しない（上段）及び接触する（下段）、同族ミクロａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石無し）、及び磁場において同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石）のために示される。図１６Ｃ、クラスタ検出アルゴリズムで特定された平均クラスタ領域及び細胞当たりのクラスタ（２０細胞／群、粒子と接触する細胞と粒子と接触しない細胞との間に均等に分割される）。対照試料は、インキュベーションより前の細胞（時間０）及び非同族ミクロ粒子とともにインキュベートされた細胞（非同族）（ＡＮＯＶＡによってｐ＞０．０５）を含む。図１６Ｄ、３日間０．２Ｔ磁場を伴う（赤色）及び伴わない（黒色）５ｎｇ（左）及び１０ｎｇ（右）のＭＨＣ－Ｉｇ用量のミクロａＡＰＣとともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。４日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１６Ｅ、刺激の７日後０．２Ｔ磁場を伴う及び伴わない漸増用量のミクロａＡＰＣとともにインキュベートされたｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖倍率（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＞０．０５）。
【図１６－２】磁場におけるミクロａＡＰＣによるＴＣＲクラスタ形成及び増殖。図１６Ａ、磁場におけるミクロａＡＰＣ凝集。磁場の適用の前（左）及び後（右）に示されるミクロａＡＰＣ（赤色）の代表的な共焦点像。図１６Ｂ、ミクロａＡＰＣ磁気凝集はＣＤ３凝集を誘導しない。細胞は、ＬＦＡ－１（緑色）、ミクロａＡＰＣ上のＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）、及びＣＤ３ε（深紅色）に対する抗体で標識された。ミクロａＡＰＣは全ての３つのチャネルにおいて、特に赤色及び深紅色チャネルにおいて、自己蛍光を示した。代表的な画像は、両方ミクロａＡＰＣと接触しない（上段）及び接触する（下段）、同族ミクロａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石無し）、及び磁場において同族ナノａＡＰＣとともにインキュベートされた細胞（磁石）のために示される。図１６Ｃ、クラスタ検出アルゴリズムで特定された平均クラスタ領域及び細胞当たりのクラスタ（２０細胞／群、粒子と接触する細胞と粒子と接触しない細胞との間に均等に分割される）。対照試料は、インキュベーションより前の細胞（時間０）及び非同族ミクロ粒子とともにインキュベートされた細胞（非同族）（ＡＮＯＶＡによってｐ＞０．０５）を含む。図１６Ｄ、３日間０．２Ｔ磁場を伴う（赤色）及び伴わない（黒色）５ｎｇ（左）及び１０ｎｇ（右）のＭＨＣ－Ｉｇ用量のミクロａＡＰＣとともにインキュベートされたＰｍｅｌ　Ｔ細胞。４日目にＣＦＳＥ希釈によって評価された増殖。図１６Ｅ、刺激の７日後０．２Ｔ磁場を伴う及び伴わない漸増用量のミクロａＡＰＣとともにインキュベートされたｐｍｅｌ　Ｔ細胞の増殖倍率（二元ＡＮＯＶＡによってｐ＞０．０５）。
【００１９】

【図１７】ネオジムディスク磁石による培養において作り出された磁場強度。ＦＥＭＭ（有限要素法磁気学）ソフトウェアを用いた有限要素分析によって推定される培養における磁場強度の密度グラフ。ディスク磁石（深紅色）厚さ3/4インチ、1/2インチ、及び1/4インチを使用して最大０．２２５Ｔ、０．２００Ｔ、及び０．１５０Ｔそれぞれの磁場を作り出した。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

要旨

本開示は、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのリンパ球に影響する分子と、抗原に結合するときに固有のクローン形質リンパ球受容体、すなわち、抗原特異的リンパ球受容体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つ分子複合体と、を含むナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）を提供する。

【００２１】

本開示は、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含むナノａＡＰＣを提供する。

【００２２】

本開示は、ナノ粒子、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＴ細胞共刺激分子、及びナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＭＨＣクラスＩ分子複合体を含むナノａＡＰＣを提供する。少なくとも１つのＭＨＣクラスＩ分子複合体は少なくとも２つの融合タンパク質を含む。第１の融合タンパク質は、第１のＭＨＣクラスＩα鎖及び第１の免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質は、第２のＭＨＣクラスＩα鎖及び第２の免疫グロブリン重鎖を含む。第１及び第２の免疫グロブリン重鎖は会合して、ＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成する。ＭＨＣクラスＩ分子複合体は、第１のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙及び第２のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む。

【００２３】

本開示は、３段落上に記載される複数のナノａＡＰＣを含む調製物を提供する。

【００２４】

本開示は、抗原特異的Ｔ細胞の形成を誘導する方法を提供する。本方法は、複数の前駆Ｔ細胞を含む単離された調製物を、Ｔ細胞に影響する分子及び少なくとも１つの抗原結合間隙を含む抗原提示複合体を含む少なくとも１つの第１のナノａＡＰＣと接触させることを含む。抗原は抗原結合間隙に結合する。それにより、複数の前駆Ｔ細胞のメンバーは、抗原を認識する抗原特異的Ｔ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導される。第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合は、前駆Ｔ細胞が、ＣＤ３に特異的に結合する抗体を含むが、抗原提示複合体を含まないナノａＡＰＣとともにインキュベートされる場合に形成される抗原特異的Ｔ細胞の数または割合を超える。

【００２５】

本開示は、細胞の集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合を増加させる方法を提供する。本方法は、抗原特異的Ｔ細胞を含む第１の細胞集団を、Ｔ細胞に影響する分子及び少なくとも１つの抗原結合間隙を含む抗原提示複合体を含む少なくとも１つの第１のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含む。抗原は抗原結合間隙に結合する。インキュベーションは、第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗原特異的Ｔ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される。

【００２６】

本開示は患者の免疫応答を調節する方法を提供する。本方法は、（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与することを含む。複数の粒子のメンバーは（１）少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子と、（２）少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含む。少なくとも１つの抗原提示複合体は少なくとも１つの抗原結合間隙を含む。抗原は少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する。

【００２７】
本開示は患者の免疫応答を抑制する方法を提供する。本方法は、（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与することを含む。複数の粒子のメンバーは（１）少なくとも１つのアポトーシス誘導分子と、（２）少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含む。少なくとも１つの抗原提示複合体は少なくとも１つの抗原結合間隙を含む。抗原は少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する。
【００２８】
本開示は、集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合を増加させる方法を提供する。本方法は、複数の前駆Ｂ細胞を含む単離された調製物を、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含む少なくとも１つの第１のナノａＡＰＣと接触させることを含む。それにより、複数の前駆Ｂ細胞のメンバーは、抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を産生する抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導される。
【００２９】
本開示は、集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合を増加させる方法を提供する。本方法は、抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含む少なくとも１つの第１のナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含む。インキュベーションは、第１の細胞集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合と比べて増加した数または割合の抗体産生Ｂ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な時間実行される。
【００３０】
本開示は、集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合を増加させる方法を提供する。本方法は、複数の前駆Ｂ細胞を含む単離された調製物をナノａＡＰＣの調製物と接触させることを含む。ナノａＡＰＣは、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つの分子複合体と、を含む。それにより、複数の前駆Ｂ細胞のメンバーは、抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を産生する抗体産生Ｂ細胞を含む第１の細胞集団を形成するように誘導される。
【００３１】
本開示は患者の免疫応答を調節する方法を提供する。本方法は、（Ａ）複数の粒子と、（Ｂ）薬学的に許容される担体と、を含む調製物を患者に投与することを含む。複数の粒子のメンバーは、（１）少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子と、（２）Ｂ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う少なくとも１つの分子複合体と、を含む。
【００３２】
本開示はポリクローナルＴ細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞を濃縮する方法を提供する。本方法は、ポリクローナルＴ細胞集団を、ナノ粒子と、ナノ粒子の表面上の少なくとも１つのリンパ球に影響する分子と、抗原に結合するときに抗原特異的リンパ球受容体とかみ合うナノ粒子の表面上の少なくとも１つ分子複合体と、を含むナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含む。ナノａＡＰＣは架橋抗体またはオリゴマー化分子をさらに含む。
【００３３】
本開示はＴ細胞を活性化する方法を提供する。本方法は、磁場の存在下で、Ｔ細胞の集団を、Ｔ細胞に影響する分子と、少なくとも１つの抗原結合間隙を含む抗原提示複合体と、を含むナノａＡＰＣとともにインキュベートすることを含む。ナノａＡＰＣは常磁性である。
【００３４】

本開示は、抗原特異的Ｔ細胞の集団を、それを必要とする患者に提供する方法であって、

（１）複数のナノａＡＰＣが、その表面上に（ｉ）少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子と、（ｉｉ）抗原を含む少なくとも１つの抗原結合間隙を含む少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含む常磁性ナノ粒子であり、抗原特異的Ｔ細胞を生成するのに十分な強度の磁場の存在下で、Ｔ細胞の単離された集団を複数のナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）と接触させることと、

（２）ナノａＡＰＣに結合する抗原特異的Ｔ細胞の複合体をＴ細胞の単離された集団から単離することと、

（３）複合体を患者に投与することと、を含む方法を提供する。

本方法のいくつかの変形において、Ｔ細胞の単離された集団はナイーブＴ細胞を含む。これらの方法のいくつかの変形において、複合体は磁気濃縮カラム、フローサイトメトリー、または分画遠心法を使用して単離される。本方法のいくつかの変形において、複合体は、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路によって投与される。

【００３５】

本開示は、抗原特異的Ｔ細胞の集団を、それを必要とする患者の標的領域に提供する方法であって、

（１）複数のナノａＡＰＣが、常磁性であり、かつその表面上に（ｉ）Ｔ細胞に影響する分子と、（ｉｉ）抗原結合間隙と抗原との結合が固有の抗原特異的リンパ球受容体とかみ合う、抗原結合間隙を含む、抗原提示複合体と、を含み、抗原特異的Ｔ細胞を刺激するのに十分な強度の磁場の存在下で、複数のナノスケール人工抗原提示細胞（ナノａＡＰＣ）を患者に投与することと、

（２）固有の抗原特異的リンパ球受容体とかみ合う抗原を含む標的領域に磁場を適用し、それにより、ナノａＡＰＣを標的領域に向けることと、を含む方法を提供する。

【００３６】

段落［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、ナノａＡＰＣは、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路によって投与される。

【００３７】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つの抗原提示複合体はＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む。

【００３８】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つの抗原提示複合体はＭＨＣクラスＩ分子である。これらの変形のいくつかにおいて、少なくとも１つの抗原提示複合体は、少なくとも２つの融合タンパク質を含むＭＨＣクラスＩ分子複合体であり、第１の融合タンパク質が、第１のＭＨＣクラスＩα鎖及び第１の免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が、第２のＭＨＣクラスＩα鎖及び第２の免疫グロブリン重鎖を含み、第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、ＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成し、ＭＨＣクラスＩ分子複合体が、第１のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙及び第２のＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含む。

【００３９】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つの抗原提示複合体はＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を含む。これらの変形のいくつかにおいて、抗原提示複合体はＭＨＣクラスＩＩ分子である。これらの変形のいくつかにおいて、抗原提示複合体は、少なくとも４つの融合タンパク質を含むＭＨＣクラスＩＩ分子複合体であり、（ａ）２つの第１の融合タンパク質が（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメインと、を含み、（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインと、を含み、２つの第１の融合タンパク質及び２つの第２の融合タンパク質が会合して、

ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体を形成し、各第１の融合タンパク質のＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質のＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインが、ＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を形成する。これらの変形のいくつかにおいて、免疫グロブリン重鎖は可変領域を含む。

【００４０】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、抗原ペプチドは少なくとも１つの抗原結合間隙に結合する。これらの変形のいくつかにおいて、抗原ペプチドは、腫瘍関連抗原のペプチド、自己抗原のペプチド、同種抗原のペプチド、及び感染病原体抗原のペプチドからなる群から選択される。

【００４１】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、ナノＡＰＣは少なくとも２つの抗原提示複合体を含む。これらの変形のいくつかにおいて、同一の抗原は少なくとも２つの抗原提示複合体の各抗原結合間隙に結合する。これらの変形のその他において、異なる抗原は少なくとも２つの抗原提示複合体の各抗原結合間隙に結合する。いくつかの変形において、第１の抗原提示複合体は、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含み、第２の抗原提示複合体は、少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を含む。

【００４２】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つの抗原提示複合体は非古典的なＭＨＣ様分子である。これらの変形のいくつかにおいて、非古典的なＭＨＣ様分子はＣＤ１ファミリーメンバーである。非古典的なＭＨＣ様分子は、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、及びＣＤ１ｅからなる群から選択され得る。

【００４３】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子はＴ細胞共刺激分子である。Ｔ細胞共刺激分子は、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、Ｂ７－Ｈ３、４－１ＢＢＬ、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ１３４（ＯＸ－４０Ｌ）、Ｂ７ｈ（Ｂ７ＲＰ－１）、ＣＤ４０、ＬＩＧＨＴ、ＣＤ２８に特異的に結合する抗体、ＨＶＥＭに特異的に結合する抗体、ＣＤ４０Ｌに特異的に結合する抗体、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体、及び４－１ＢＢに特異的に結合する抗体からなる群から選択され得る。

【００４４】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子は接着分子である。

【００４５】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、接着分子はＩＣＡＭ－１及びＬＦＡ－３からなる群から選択される。

【００４６】

段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子はＴ細胞成長因子である。Ｔ細胞成長因子はサイトカイン及び超抗原からなる群から選択され得る。サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びγインターフェロンからなる群から選択され得る。Ｔ細胞成長因子は、（Ａ）第１の融合タンパク質が、第１のサイトカイン及び免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が、第２のサイトカイン及び第２の免疫グロブリン重鎖を含み、第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、第１の分子複合体を形成する、少なくとも２つの融合タンパク質を含む第１の分子複合体及び（Ｂ）（ａ）２つの第１の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン重鎖及び（ｉｉ）第１のサイトカインを含み、（ｂ）２つの第２の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン軽鎖及び（ｉｉ）第２のサイトカインを含み、２つの第１の融合タンパク質及び２つの第２の融合タンパク質が会合して、第２の分子複合体を形成する、少なくとも４つの融合タンパク質を含

む第２の分子複合体からなる群から選択され得る。
【００４７】
上に記載される変形のいくつかにおいて、Ｔ細胞成長因子は第１の分子複合体である。これらの変形のいくつかにおいて、第１及び第２のサイトカインは同一である。これらの変形のその他において、第１及び第２のサイトカインは異なる。
【００４８】
上に記載される変形のいくつかにおいて、Ｔ細胞成長因子は第２の分子複合体である。これらの変形のいくつかにおいて、第１及び第２のサイトカインは同一である。これらの変形のその他において、第１及び第２のサイトカインは異なる。
【００４９】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子は制御性Ｔ細胞インデューサー分子である。Ｔ細胞インデューサー分子は、ＴＧＦβ、ＩＬ－１０、インターフェロン－α、及びＩＬ－１５からなる群から選択され得る。
【００５０】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子はアポトーシス誘導分子である。アポトーシス誘導分子は、毒素、ＴＮＦα、及びＦａｓリガンドからなる群から選択され得る。
【００５１】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、ナノａＡＰＣは少なくとも２つの異なるＴ細胞に影響する分子を含む。
【００５２】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、インキュベーションは、３７℃で１０分～３日間実行される。
【００５３】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、抗原特異的Ｔ細胞は細胞傷害性Ｔ細胞である。
【００５４】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、抗原特異的Ｔ細胞はヘルパーＴ細胞である。
【００５５】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、抗原特異的Ｔ細胞は制御性Ｔ細胞である。
【００５６】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、患者は癌、自己免疫疾患、感染症を有するか、または免疫抑制させられている。
【００５７】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、前駆Ｔ細胞は患者から得られる。
【００５８】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、前駆Ｔ細胞は患者ではないドナーから得られる。
【００５９】
段落［３４］及び［３５］に記載される方法のいくつかの変形において、抗原特異的Ｔ細胞は、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与からなる群から選択される投与経路によって投与される。
【００６０】
本開示は、ナノ粒子、例えば、磁気ナノ粒子を使用して、異なる生理状態における細胞（例えば、ナイーブ対以前に活性化したＴ細胞）を標的化し、標的細胞集団を刺激する方法を提供する。例えば、図９Ｃに示され、以下の特定の例においてより詳細が考察される

通り、３２ｎｇの用量のＭＨＣを提供するナノａＡＰＣは、１週間後に２０及び３０倍の間でナイーブ及び以前に活性化されたＴ細胞の両方を刺激する。しかしながら、８ｎｇまたは３．２ｎｇのＭＨＣでは、活性化Ｔ細胞のみが刺激された。したがって、例えば、３．２～８ｎｇのＭＨＣを含む用量のナノａＡＰＣを使用して、その集団におけるナイーブＴ細胞に影響を及ぼすことなく、Ｔ細胞集団における以前に活性化されたＴ細胞を刺激することができる。

【００６１】

本開示は、以前に活性化されたＴ細胞対ナイーブＴ細胞を差次的に刺激する方法を提供する。いくつかの変形において、３．２～８ｎｇのＭＨＣ対３２ｎｇのＭＨＣを含むナノａＡＰＣを使用して、ナノａＡＰＣ結合及びＴ細胞の単離をＴ細胞の活性化から分離し得る。いくつかの変形において、Ｔ細胞の集団は、例えば、ナイーブＴ細胞のために濃縮された集団を残すＣＤ４４に対する抗体を使用して、以前に活性のＴ細胞を実質的に枯渇させる。ナノａＡＰＣに結合するナイーブＴ細胞はその増殖を可能にするであろう。次いで、結合ナノａＡＰＣを含むナイーブＴ細胞は、Ｔ細胞ナノａＡＰＣ複合体を磁場に曝露することによって活性化され得る。

【００６２】

本開示は、例えば、Ｂ細胞及び幹細胞を含む他の細胞の治療として、分離、特性評価、及び使用する方法を提供する。異なる生理状態における集団の細胞を差次的に活性化するであろうナノ粒子の表面上の最適なリガンド密度（または、代替的に、かかるリガンドを含むナノ粒子の用量）は、下の実施例９に記載されるものなどの方法を使用して判定される。細胞集団次第で、リガンドは、例えば、抗体または抗体の一部、ペプチド、ヌクレオチド、炭水化物、脂質、所与の受容体のための天然リガンドの全てまたは一部（例えば、ＥＧＦ、ＰＤＧＦ）、化学物質（例えば、クロム塩またはＦＫＢＰ結合ドメインなどのイムノフィリン分子受容体と結合する一価合成リガンド）、単一抗インテグリンＦａｂフラグメント、ＲＧＤペプチドなどを含み得る。

【００６３】

詳細な説明

免疫療法は、疾患を治療するための免疫細胞の活性化及び増殖を含む。細胞傷害性（ＣＤ８＋）リンパ球（ＣＴＬ）応答の誘導は、療法に対して魅力的である、なぜなら、ＣＴＬは所与の腫瘍抗原または病原体に特異的であり、いくつかのログを増殖して堅固な応答を生成し、疾患の再発を予防することができる長期メモリを生じさせる（１）。ＣＴＬは、インビボで直接活性化され得、インビトロで増殖し得、患者に養子移植され得る（３、４）。

【００６４】

刺激シグナルを細胞傷害性リンパ球に送達する人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）は、インビトロ及びインビボの免疫療法のための強力なツールである。今までは、粒子系ａＡＰＣは、Ｔ細胞活性化タンパク質を直径が数ミクロンの剛性支持体に結合させることによって合成されてきた。例えば、我々は、２つの必要で十分なＴ細胞活性化シグナルを送達するタンパク質を結合させることによって、細胞サイズの４．５μｍ直径（「ミクロスケール」）ビーズ系Ｔ細胞増殖プラットフォームを以前に開発した（５、６）。Ｔ細胞活性化のために必要なＡＰＣ上に存在するシグナルは、シグナル１、ＴＣＲと結合する主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）との関連で提示される同族抗原ペプチド（７）、及びシグナル２、Ｔ細胞応答を調節する一群の共刺激受容体を含む。この系のいくつかの実施形態において、シグナル１は、特異的ペプチド（ＭＨＣ－Ｉｇ）で充填されたキメラＭＨＣ－免疫グロブリンダイマーによって授与され、シグナル２は、Ｂ７．１（Ｔ細胞受容体ＣＤ２８の天然リガンド）またはＣＤ２８に対する活性化抗体のいずれかである。両方のタンパク質は、ミクロスケール（４．５μｍ）ビーズの表面に直接化学的に結合されて、人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）を作り出す。

【００６５】

しかしながら、ミクロスケールａＡＰＣにいくつかの欠点がある。大きなビーズは毛細

血管床中に定着し得、静脈内に注射されるときに組織損傷を誘導し得る。皮下に注射されるとき、ミクロンサイズのビーズは、ほとんどのＴ細胞が存在するリンパ節に容易には運搬されない（８、９）。さらに、ミクロンサイズのビーズは、細網内皮系の食細胞によって、優先的に排除されることで知られる（１０、１１）。

【００６６】

本開示は、様々なナノスケールａＡＰＣ（ナノａＡＰＣ）を提供することによってこれらの制限を克服する。我々の知っている限りでは、これがＴ細胞増殖を誘導するナノスケールビーズ系ａＡＰＣの最初の記載である。ナノ粒子は、抗原または薬物の摂取のため評価されてきたが、ａＡＰＣプラットフォームは、ナノ粒子－細胞界面で起こるために特異的細胞表面受容体－リガンド相互作用を必要とする。研究は、直径が２ミクロンを超えるビーズのみが、Ｔ細胞増殖を誘導できることを示唆し（１６、１７）、量子ドットナノ結晶などのより小さなサイズの粒子との研究は、ＴＣＲ－ＭＨＣ相互作用の生物物理学的態様を研究するためにこれらの試薬の使用に焦点を当ててきた（１５）。直接試験したとき、最近の研究は、ナノ粒子が、報告された増殖無しに短期機能応答を誘導するのにミクロビーズよりかなり非効率であることを実証した（１８）。

【００６７】

したがって、本明細書に記載されるナノａＡＰＣが、ＴＣＲトランスジェニックマウス脾細胞及びヒトポリクローナル末梢血Ｔ細胞の両方から抗原特異的Ｔ細胞増殖を誘導することは予想外であった。刺激されたＴ細胞は、再チャレンジ後にＩＦＮγを脱顆粒及び産生する堅固なエフェクター表現型を有した。本明細書に記載されるナノスケールａＡＰＣはまた、インビボで注射されるとき皮下マウスメラノーマモデルにおける腫瘍拒絶を媒介する。

【００６８】

以下の研究実施例に記載される実施形態を制限するものではないが、これらの実施例は、ナノａＡＰＣの２つの実施形態、（１）５０～１００ｎｍの直径の生体適合性鉄デキストラン常磁性ビーズ及び（２）２０ｎｍ未満の直径のアビジンコーティングされた量子ドットナノ結晶を示す。これらの実施形態において、シグナル１はペプチド－ＭＨＣ複合体によって提供され、シグナル２はＢ７．１－Ｉｇまたは抗ＣＤ２８によって提供される。

【００６９】

ナノａＡＰＣは新たな粒子に基づく免疫療法方策の探索を可能にする。上に留意した通り、ミクロスケールａＡＰＣはリンパ管によって運搬されるには大きすぎ、皮下に注射されるときに注射部位に留まる。静脈内に注射されるとき、それらは毛細血管床中に定着する。実際のところ、ミクロスケールビーズの輸送不良は、ａＡＰＣが最適な免疫療法のためにどこを通行するべきかの研究を妨げた。ナノａＡＰＣの輸送及び体内分布は、ミクロスケールａＡＰＣよりも効率的である可能性が高く、したがって、新たなインビボの免疫療法方策の探索を可能にする。

【００７０】

例えば、ａＡＰＣが最も有効であり得る２つの潜在的部位は、ナイーブ及びメモリＴ細胞が存在するリンパ節及び腫瘍それ自体である。おおよそ５０～１００ｎｍの直径のナノ粒子はリンパ管によって摂取され得、リンパ節に移送され（８、３０）、したがって、Ｔ細胞のより大きなプールへのアクセスを得る。以下の実施例に記載される通り、ナノａＡＰＣの皮下注射は、対照または静脈内注射されたビーズよりも少ない腫瘍成長をもたらした。これは、最適なインビボのＴ細胞増殖のための潜在的機序としての細胞外空間からリンパ節へのナノａＡＰＣのドレナージを提示する。加えて、ナノスケール送達ビヒクルは、乏しく形成された腫瘍脈管構造のため、ＥＰＲ効果（Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｔｙ　Ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ　ｅｆｆｅｃｔ）を通じて腫瘍中に優先的に蓄積する（４５、４６）。原位置で免疫賦活性シグナルを送達することによって、腫瘍ミクロ環境におけるａＡＰＣは、癌免疫療法における最も顕著な障害のうちの１つ、免疫抑制性腫瘍ミクロ環境に対処し得る（４７）。

【００７１】

いくつかの実施形態において、ナイーブＴ細胞応答の刺激は、患者に投与後、クラスタ形成ナノａＡＰＣによって達成され得る。２つの方策が以下の実施例７に示されるが、他の方策も使用され得る。第１の方策において、磁気ナノａＡＰＣビーズは、刺激より前に、抗腫瘍、抗原特異的Ｔ細胞を濃縮するために使用された。この説明に束縛されるものではないが、我々は、濃縮がサイトカイン利用能を増加させ、インビトロのＴ細胞増殖のためのより良い環境を提供すると考える。第２の方策において、磁気ナノａＡＰＣビーズ及びＴ細胞は、ナノａＡＰＣ媒介活性化を上昇させる磁場においてインキュベートされた。この方策は、短期細胞培養または磁石誘導された活性化用ではない市販の細胞濃縮カラムに基づく、インビトロの培養系の発展を必要とした。クラスタ形成はまた、例えば、ナノａＡＰＣを「キャップ」する二次抗体またはビーズを使用して、達成され得る。例えば、ナノａＡＰＣまたはオリゴマー化分子上のタンパク質に対する架橋抗体（例えば、オリゴヌクレオチドまたはナノａＡＰＣ表面に対する抗体）を使用して、クラスタ形成を達成し得る。

【００７２】

抗原特異的Ｔ細胞及び抗体特異的Ｂ細胞、それぞれのエクスビボ増殖のためのナノａＡＰＣの使用は、いくつかの重大な利点を有する。ナノａＡＰＣは実施され得、再現可能な抗原提示または抗体誘導活性を有し、大きな患者集団のために使用され得る。ナノａＡＰＣの使用は、樹状細胞を使用する方法と比較して、抗原特異的Ｔ細胞のエクスビボ増殖過程を劇的に単純化及び短縮させ、治療使用に好適な数への前駆体ＴまたはＢ細胞の増殖を誘導し得る。加えて、ナノａＡＰＣは、１つのステップにおいて、前駆体ＴまたはＢ細胞単離を抗原特異的刺激と組み合わせることができる。

【００７３】

Ｔ細胞受容体は、かみ合いの後に内部に取り入れられ（４０）、ナノａＡＰＣが、Ｔ細胞受容体の両方を刺激し、その後、ｓｉＲＮＡなどの細胞内積荷を送達する可能性を示唆する。

【００７４】

ＴＣＲ－ＭＨＣ相互作用は、細胞７上に存在するＭＨＣ及び細胞サイズのＭＨＣコーティングされた粒子[8～11]のために広範囲にわたって研究されてきたが、細胞－ナノ粒子界面での受容体－リガンド相互作用は良く理解されていなかった。[12]以下及び特定の実施例において記載される通り、ナノ粒子結合及び細胞活性化は、Ｔ細胞活性化の間特に重要である膜空間組織に敏感であり、磁場を使用して、クラスタ結合ナノ粒子を、活性化を向上させるように操作し得る。例えば、Ｔ細胞活性化は、持続的に向上されたナノスケールＴＣＲクラスタ形成の状態を誘導し[13～16]、以下に記載される通り、ナノ粒子は、より大きな粒子はそうでないように、このクラスタ形成に敏感である。

【００７５】

さらに、ＴＣＲクラスタとのナノ粒子相互作用を利用して、受容体誘発を向上させ得る。Ｔ細胞活性化は、何百のナノメートルにわたる「シグナル伝達クラスタ」を伴い、シグナル伝達タンパク質[17]の凝集によって媒介され、Ｔ細胞－ＡＰＣ接触部位の周辺で初期に形成し、内部に移行する。[18]以下に記載される通り、外部磁場を使用して、ＴＣＲに結合する常磁性ナノａＡＰＣの凝集を引き起こし得、ＴＣＲクラスタの凝集及びナイーブＴ細胞の活性化の向上をもたらす。

【００７６】

磁場は、常磁性粒子に適切に強い力を働かせ得るが、別途生物学的に不活性であり、粒子挙動を制御するためにそれらを強力なツールにさせる。[19、20]以下に記載の方法において、常磁性ナノａＡＰＣに結合するＴ細胞は外部に適用された磁場の存在下で活性化される。ナノａＡＰＣはそれ自体が磁化され、磁場源及び磁場における近くのナノ粒子両方に引きつけられ、[20、21]ビーズ、ひいては、ＴＣＲ凝集を誘導して、ａＡＰＣ媒介活性化を上昇させる。

【００７７】

以下の特定の実施例に示される通り、ナノａＡＰＣはより多くのＴＣＲと結合し、ナイ

ーブＴ細胞と比較して、以前に活性化されたものより大きな活性化を誘導する。加えて、外部磁場の適用は、ナイーブ細胞上のナノａＡＰＣ凝集を誘導し、インビトロ及び養子移植後のインビボの両方でのＴ細胞増殖を向上させる。重要なことに、メラノーマ養子免疫治療モデルでは、磁場においてナノａＡＰＣによって活性化されたＴ細胞が腫瘍拒絶を媒介する。したがって、適用された磁場の使用は、別途、刺激にあまり応答しないナイーブＴ細胞集団の活性化を可能にする。ナイーブＴ細胞は、より高い増殖能及び強い長期Ｔ細胞応答を作り出すより優れた能力を伴う、癌免疫療法４３～４５のためのより分化された亜型よりも有効であることが示されたが、これは、免疫療法の重大な特徴である。したがって、本開示は新規の手法を提供し、それによって、ナノａＡＰＣは、Ｔ細胞の磁場向上活性化に結合されて、ナイーブ前駆体から増殖した抗原特異的Ｔ細胞の収率及び活性を増加させ、例えば、感染症、癌、もしくは自己免疫疾患を有する患者のため、または免疫抑制された患者に予防的保護を提供するための細胞療法を改善する。

【００７８】

ナノａＡＰＣ

別途示されない限り、「ナノａＡＰＣ」は、少なくとも１つのリンパ球に影響する分子及び少なくとも１つの抗原結合間隙を含む少なくとも１つの抗原提示複合体を含む。任意選択で、抗原は抗原結合間隙に結合し得る。

【００７９】

いくつかの実施形態において、ナノａＡＰＣは、少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子及び少なくとも１つの抗原結合間隙を含む少なくとも１つの抗原提示複合体を含む。任意選択で、抗原は抗原結合間隙に結合し得る。

【００８０】

ナノａＡＰＣを使用して、抗体形成を刺激し得る。これらの実施形態において（本明細書において「抗体誘導ナノａＡＰＣ」とも称される）、ナノａＡＰＣは、少なくとも１つのＢ細胞に影響する分子（例えば、以下に記載される、ＣＤ４０リガンド、サイトカイン、またはサイトカイン分子複合体）及びＢ細胞表面免疫グロブリンとかみ合うか、またはＢ細胞の表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う少なくとも１つの分子複合体を含む。

【００８１】

ナノ粒子

ナノ粒子は、例えば、鉄、ニッケル、アルミニウム、銅、亜鉛、カドミウム、チタン、ジルコニウム、スズ、鉛、クロム、マンガン、及びコバルトなどの金属、酸化アルミニウム、酸化クロム、酸化鉄、酸化亜鉛、及び酸化コバルトなどの金属酸化物及び水和酸化物、マグネシウム、アルミニウム、亜鉛、鉛、クロム、銅、鉄、コバルト、及びニッケルなどの金属ケイ酸塩、青銅、黄銅、ステンレス鋼、その他などの合金から作製され得る。ナノ粒子はまた、セルロース、セラミック、ガラス、ナイロン、ポリスチレン、ゴム、プラスチック、またはラテックスなどの非金属または有機材料から作製され得る。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、金属及び非金属または有機化合物の組み合わせ、例えば、メタクリル酸塩またはスチレンコーティングされた材料及びケイ酸塩コーティングされた材料を含む。基材は薬剤を用いてドープ塗料を塗られて、その物理的または化学的性質を変化させ得る。例えば、希土類酸化物は、アルミノケイ酸塩ガラス中に含まれて、高密度を有する常磁性ガラス材料を生成し得る（Ｗｈｉｔｅ　＆　Ｄａｙ，Ｋｅｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｖｏｌ．９４－９５，１８１－２０８，１９９４参照）。いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、生分解性有機材料、例えば、セルロース、デキストランなどを含むか、またはそれらからなる。好適な市販の粒子は、例えば、ニッケル粒子（Ｎｏｖａｍｅｔ　Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｗｙｃｋｏｆｆ，Ｎ．Ｊ．によって販売される１２３型、ＶＭ６３、１８／２０９Ａ、１０／５８５Ａ、３４７３５５、及びＨＤＮＰ、Ｓｐｅｘ，Ｉｎｃ．によって販売される０８８４１Ｒ、Ａｌｄｒｉｃｈによって販売される０１５０９ＢＷ）、ステンレス鋼粒子（Ａｍｅｔｅｋによって販売されるＰ３１６Ｌ）、亜鉛末（Ａｌｄｒｉｃｈ）、パラジウム粒子（Ｄ１３Ａ１７、Ｊｏｈｎ　Ｍａｔｔｈｅｙ　Ｅｌｅｃ．）、及び$TiO_2$、$SiO$

$_2$、またはＭｎＯ$_2$粒子（Ａｌｄｒｉｃｈ）を含む。

【００８２】

粒子の密度は、粒子が細胞よりも迅速に試料懸濁液によって差次的に沈殿するように選択され得る。したがって、粒子は、好ましくは、細胞分離及び粒子の操作を促進するために高密度材料でできている。かかる粒子の使用は粒子に重力下で沈殿させて、抗原特異的Ｔ細胞、Ｔ細胞前駆体、Ｂ細胞前駆体、Ｂ細胞、または他の細胞からのそれらの分離を促進する。

【００８３】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、タンパク質がその表面に結合する前にコーティングされる。一旦、コーティング化学物質が選択されたら、ナノ粒子の表面は活性化されて、特定のタンパク質分子の特異的付着を可能にさせ得る。したがって、コーティングは、様々なＴもしくはＢ細胞集団またはＴもしくはＢ前駆体細胞集団との最適な反応性及び生体適合性を視野に入れて選択され得る。好ましくは、どのようなコーティング化学物質が使用されたとしてもさらなる活性化化学物質のために好適なマトリックスを提供する。多数のかかるコーティングが当該技術分野において周知である。例えば、ナノ粒子は、ヒト血清アルブミン、トリス（３－メルカプトプロピル）－Ｎ－グリシルアミノ）メタン（米国特許第６，０７４，８８４号）、ゼラチン－アミノデキストラン（米国特許第５，４６６，６０９号）、またはアミノ酸ホモポリマーもしくはランダムコポリマーでコーティングされ得る。いくつかの実施形態において、ポリ（グルタミン酸塩、リジン、チロシン）［６：３：１］を含むランダムアミノ酸コポリマーが使用され、このコポリマーはＳｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．から製品番号Ｐ８８５４として入手可能である。６部のグルタミン酸、３部のリジン、及び１部のチロシンの比率におけるアミノ酸グルタミン酸、リジン、及びチロシンの直鎖状ランダムポリマーである。いくつかの実施形態において、４部のリジンと１部のチロシンとの比率におけるリジン及びチロシンを含むアミノ酸コポリマーが使用される。いくつかの実施形態において、１部のリジンと１部のアラニンとの比率におけるリジン及びアラニンを含むアミノ酸コポリマーが使用される。

【００８４】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、合成ポリマーでコーティングされ、次いで、合成ポリマーは、ＴもしくはＢ細胞に影響する分子、抗原提示複合体、またはＢ細胞表面免疫グロブリンもしくはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う分子複合体を含むがこれらに限定されないタンパク質分子に連結する前に、活性化される。

【００８５】

いくつかの実施形態において、ニッケル表面（特に、粒子）に特に良く適合する、ナノ粒子はケイ酸でコーティングされる。ケイ酸表面は、より一般的に使用される有機ポリマー表面を超えるいくつかの利点を有する。それは、高度に均質で、化学的に定義され、かつ化学的及び熱的に安定しており、シラノール残基が全表面を被覆し、タンパク質及び他の生体分子を付着させるためのトリエトキシシランのアミノまたはエポキシ誘導体との安定した共有結合のために利用可能である。シラン誘導体は、全表面を被覆し得、表面上の特異的及び非特異的相互作用に対して高い度合の制御を可能にする二次元ポリマーの単層を形成する。ケイ酸で様々な固体支持体をコーティングするための方法は、米国特許第２，８８５，３９９号に記載され、Ｂｉｒｋｍｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃｈｅｍ．１９８７　Ｓｅｐ；３３（９）：１５４３－７も参照されたい。例えば、ナノ粒子は、メタケイ酸ナトリウム、アルミン酸ナトリウム、及びホウ酸の溶液とともにインキュベートされて、表面上に沈着する重合ケイ酸を形成し得る。ケイ酸コーティングの別の方法は、ケイ酸ナトリウムをナノ粒子と混合し、９５℃で硫酸を用いてｐＨを下げ、続いて、水で洗浄することである。米国特許第２，８８５，３６６号；Ｅａｇｅｒｔｏｎ，ＫＯＮＡ　１６，４６－５８，１９９８を参照されたい。例えば、ニッケル表面は、最初に、０．２ＮのＮａＳＯ$_4$溶液中にそれらを分散させ、その溶液を９５℃に加熱させることによってコーティングされ得る。ｐＨはＮａＯＨで１０に調節される。次いで硫酸中のケイ酸ナトリウムは添加され、９５℃で０．５時間混合される。支持体は数回蒸留水で洗浄され

る。コーティングの範囲は、硝酸消化に対する支持体の耐性を判定することによって検査され得る。Ｘ線散乱に基づく表面化学組成のためのＥＳＣＡ分析を使用して、支持体表面の元素組成を得ることができ、表面コーティング及び活性残基とのシラン化の度合の情報を提供する。

【００８６】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子上の表面マトリックスは、酸化アルミニウムなどの無毒性金属酸化物コーティングでニッケル表面を「不動態化する」ことによって提供される。コーティングの他の方法は、酸化アルミニウムなどの金属酸化物をナノ粒子の表面に沈着させることを含む。酸化アルミニウムは、タンパク質共役のために官能基化され得る低い非特異的結合性質を伴う不活性表面を提供するため、有用なマトリックスである。

【００８７】

酸化アルミニウムコーティングは、非晶質酸化アルミニウムの薄い連続層が、ナノ粒子上へのアルミニウゾルゲルの蒸発、続いて、空気中での焼成で酸化物を形成することによって形成される、ゾルゲル法などのいくつかの方法によって提供され得る。Ｏｚｅｒ ｅｔ ａｌ，ＳＰＩＥ ３７８９，７７－８３，１９９９。他の実施形態において、従来の物理蒸着技法（Ｓｍｉｄｔ，Ｉｎｔｅｒ Ｍａｔ Ｒｅｖ ３５，２１－２７，１９９０）または化学蒸着（Ｋｏｈ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｉｎ Ｓｏｌｉｄ Ｆｉｌｍｓ ３０４，２２２－２４，１９９７）が使用され得る。ニッケルナノ粒子が使用される場合、かかるコーティングの厚さは、ニッケル浸出を最小限にする一方で十分な安定性を提供するように制御され得る。ニッケル封止の成功はニッケルイオンの定量的化学アッセイによって試験され得る。ナノ粒子は、様々な緩衝液及び生体液において様々な温度で、インキュベートされ得、これらの培地におけるニッケルイオンのレベルが測定され得る。

【００８８】

表面コーティングの完成度は表面浸出アッセイによって判定され得る。例えば、ニッケルナノ粒子の表面がガラスまたは他の非反応性金属によって完全にコーティングされると、ナノ粒子は酸性条件下でニッケル浸出に耐性を示す。例えば、既知の質量のコーティングされたニッケルナノ粒子は１０％の硝酸においてインキュベートされ、２４時間観察され得る。ニッケルが溶解されるにつれ、溶液は緑色に変わる。未処理のニッケルは溶液を直ちに緑色に変える。その表面に酸化ニッケル層を有するニッケルナノ粒子は約２０分で溶液を緑色に変える。上述のケイ酸の層でコーティングされたナノ粒子は、８時間を超えて硝酸に耐性を示し、それは、表面上に沈着されたケイ酸の厚い層を示す。ナノ粒子はまた、ＢまたはＴ細胞活性化（以下に記載）に使用される培養条件と同様の細胞培地において支持体をインキュベートすることによって水性条件で試験され得る。溶液に浸出したニッケルの量は原子吸光分析によって測定され得る。

【００８９】

所望される場合、ナノ粒子はコーティングされる前に前処理され得る。ナノ粒子の前処理は、例えば、支持体を無菌にし、発熱物質を除去（ｄｅｐｙｒｏｇｅｎａｔｅ）し、ならびに、支持体の表面上に酸化物層を生成し得る。この前処理は金属ナノ粒子が使用されるときに特に有益である。いくつかの実施形態において、前処理は、約２００～３５０℃の範囲内の温度、好ましくは約２５０℃で、約２～６時間、好ましくは約５時間、ニッケルナノ粒子を加熱することを伴う。

【００９０】

分子は、吸着により、または共有結合を含む直接化学結合によりナノ粒子に直接付着され得る。例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，ＢＩＯＣＯＮＪＵＧＡＴＥ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９６を参照されたい。分子それ自体は、求核基、脱離基、または求電子基を含む様々な化学官能基で直接活性化され得る。活性化官能基は、ハロゲン化アルキル及びハロゲン化アシル、アミン、スルフヒドリル、アルデヒド、不飽和結合、ヒドラジド、イソシアン酸、イソチオシアン酸、ケトン、ならびに化学結合を活性化することで既知の他の基を含む。代替的には、分子は小さな

分子結合試薬の使用によってナノ粒子に結合され得る。結合試薬の非限定例としては、カルボジイミド、マレイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビスクロロエチルアミン、二官能性アルデヒド、例えば、グルタルアルデヒド、無水物などが挙げられる。他の実施形態において、分子は、当該技術分野において周知の通り、ビオチンストレプトアビジン連結または結合などの親和性結合によってナノ粒子に結合され得る。例えば、ストレプトアビジンは、共有結合または非共有結合付着によってナノ粒子に結合され得、ビオチン化分子は当該技術分野において周知である方法を使用して合成され得る。例えば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，１９９６を参照されたい。

【００９１】

ナノ粒子への共有結合が完了する場合、支持体は、典型的にはリンカーによって好適な反応物へ共有結合付着するために利用可能である１つ以上の化学部分または官能基を含有するポリマーでコーティングされ得る。例えば、アミノ酸ポリマーは、適切なリンカーを介して共有結合的に分子を結合させるのに利用可能なリジンのε－アミノ基などの基を有し得る。本開示はまた、これらの官能基を提供するためにナノ粒子上に第２のコーティングを配置することを意図する。

【００９２】

活性化化学物質を使用して、ナノ粒子の表面への分子の特異的な安定した付着を可能にし得る。タンパク質を官能基に付着するのに使用され得る多数の方法がある。Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，１９９６を参照されたい。例えば、一般的な架橋剤グルタルアルデヒドを使用して、二段階過程においてタンパク質アミン基をアミノ化ナノ粒子表面に付着し得る。結果として生じる連結は加水分解的に安定している。他の方法は、タンパク質上のアミンと反応するｎ－ヒドロ－スクシンイミド（ＮＨＳ）エステルを含有する架橋剤、アミン－、スルフヒドリル－、またはヒスチジン－含有タンパク質と反応する活性ハロゲンを含有する架橋剤、アミンまたはスルフヒドリル基と反応するエポキシドを含有する架橋剤の使用、マレイミド基とスルフヒドリル基との間の共役、及びペンダント糖部の過ヨウ素酸酸化、続いて、還元的アミノ化によるタンパク質アルデヒド基の形成を含む。

【００９３】

いくつかの実施形態において、タンパク質分子は、３－アミノプロピルトリエトキシシランを使用するケイ酸コーティングに付着する（Ｗｅｅｔａｌｌ　＆　Ｆｉｌｂｅｒｔ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．３４，５９－７２，１９７４）。この化合物は、ケイ酸表面と安定した共有結合を形成し、同時に、表面をより疎水性にさせる。シラン化反応は、共役に利用可能なアミノ基での単層の形成を可能にすることで知られる水性低ｐＨ培地中で実行され得る。タンパク質の付着は、ホモ二官能性結合剤グルタルアルデヒドを介して、またはＳＭＣＣなどのヘテロ二官能性薬剤によってなされ得る。タンパク質付着後、残留表面関連結合剤は、様々なタンパク質、親水性ポリマー、及びアミノ酸とともにインキュベートすることによって活性化され得る。アルブミン及びポリエチレングリコールは、タンパク質及び細胞の固体相への非特異的結合を阻止するので特に好適である。

【００９４】

いくつかの実施形態において、アミノシラン化を使用して、酸化アルミニウムコーティングされたナノ粒子の表面を活性化する。１９８５年の米国特許第４，５５４，０８８号を参照されたい。酸化アルミニウムコーティングされたナノ粒子の表面を活性化する別の方法は、ｇｌｕ－ｌｙｓ－ｔｙｒトリペプチドなどの強力に接着するポリマーを吸着することである。トリペプチドポリマーは、ジフルオロジニトロベンゼンなどのホモ二官能性架橋剤との反応、またはグルタルアルデヒドとの反応によるリジンアミンによって活性化され得る。次いで、タンパク質は活性化表面に直接付着され得る。

【００９５】

特異的タンパク質のナノ粒子表面への付着は、タンパク質の直接結合によって、または間接的方法を使用することによって達成され得る。特定のタンパク質は、直接付着または共役に適しているが、一方で、他のタンパク質または抗体は、抗マウスＩｇＧまたはストレプトアビジンなどのリンカーまたはスペーサータンパク質に結合するときに、より良好

な機能活性を保持する。所望される場合、リンカーまたは付着タンパク質が使用され得る。

【００９６】

同一のナノ粒子上の特定のタンパク質の比率は変化して、抗原または抗体提示におけるナノ粒子の有効性を増加させ得る。例えば、Ａ２－Ｉｇ（シグナル１）と抗ＣＤ２８（シグナル２）との最適な比率は以下の通り試験され得る。ナノ粒子は、３０：１、１０：１、３：１、１：１、０．３：１、０．１：１、及び０．０３：１などの様々な比率でＡ２－Ｉｇ及び抗ＣＤ２８と結合される。支持体に結合したタンパク質の総量は、一定に保たれるか（例えば、１５０ｍｇ／ｍｌの粒子で）、または変化し得る。サイトカイン放出及び成長などのエフェクター機能が、Ｔ細胞活性化及び分化よりもシグナル１対シグナル２に対する異なる必要条件を有し得るので、これらの機能は別々にアッセイされ得る。

【００９７】

ナノ粒子は、いくつかの分析アッセイによって特性評価されて、支持体が生成されるときに起こる添加及び反応を評価し得る。これらは、アミン及びアルデヒドなどの官能基のためのアッセイ、ならびに特定の種類のタンパク質分子の結合のためのアッセイを含む。加えて、機能アッセイを使用して、ナノ粒子の生物学的活性を評価し得る。ナノ粒子の表面に結合するタンパク質の量は、当該技術分野において既知の任意の方法で判定され得る。例えば、結合タンパク質は、２８０ｎｍでの吸収度を使用して反応溶液から除去されるタンパク質の量を判定することによって間接的に測定され得る。この実施形態において、ナノ粒子を添加する前及び後の反応溶液のタンパク質含有量は、２８０ｎｍでの吸収度によって測定され、比較される。任意の洗浄溶液中に含有されるタンパク質の量もまた、測定され、反応後溶液中に見出された量に添加される。その差はナノ粒子の表面に結合する量を示す。この方法を使用して、異なる反応条件の結合効率を迅速に選別し得る。

【００９８】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子に結合するタンパク質の量は、標識抗原及び抗体の結合アッセイによる、より直接的なアッセイにおいて測定され得る。例えば、様々な濃度の抗体共役ナノ粒子は、一定の濃度のＨＲＰ標識抗原またはヤギ－抗－マウスＩｇＧとともにインキュベートされ得る。支持体は緩衝液中で洗浄されて、非結合標識タンパク質を除去する。ＯＰＤ基質を使用して支持体関連ＨＲＰを測定することは、結合標識タンパク質の濃度を与える。ＨＲＰ標識抗体は商業的に入手することができるか、または抗体はＡｖｒａｍｅａｓ　＆　Ｔｅｒｎｙｎｃ，Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　８，１１７５－７９，１９７１のグルタルアルデヒド方法を使用して、ＨＲＰで標識することができる。

【００９９】

上述の方法は、共有結合タンパク質及び非共有結合タンパク質の両方を測定する。２つの種類の結合を区別するために、ナノ粒子は、６Ｍの塩酸グアニジンまたは８Ｍの尿素などの強力なカオトロープで洗浄され得る。非特異的結合は、これらの条件によって崩壊され、ナノ粒子を洗い落とされたタンパク質の量は、２８０ｎｍでの吸収度によって測定され得る。結合するタンパク質の総量とカオトロープで洗い落とされた量との差は、堅固に結合され、共有結合付着される可能性の高いタンパク質の量を表す。

【０１００】

ナノ粒子の構成は、形状が不規則であるものから球形のものまで、及び／または不均一または不規則な表面を有するものから平滑な表面を有するものまでと変化し得る。ナノ粒子の好ましい特性は、ＡＴＲが調製され、かつ／または使用される特定の条件に依存して選択され得る。

【０１０１】

ナノ粒子は均一または可変のサイズであり得る。粒子サイズ分布は、例えば、動的光散乱を使用して、簡便に判定され得る。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は２～５００ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０３】
いくつかの実施形態ｎｍにおいて、ナノ粒子は、２～３ｎｍ、２～４ｎｍ、２～５ｎｍ、２～６ｎｍ、２～７ｎｍ、２～８ｎｍ、２～９ｎｍ、２～１０ｎｍ、２～１１ｎｍ、２～１２ｎｍ、２～１３ｎｍ、２～１４ｎｍ、２～１５ｎｍ、２～１６ｎｍ、２～１７ｎｍ、２～１８ｎｍ、２～１９ｎｍ、２～２０ｎｍ、２～２１ｎｍ、２～２２ｎｍ、２～２３ｎｍ、２～２４ｎｍ、２～２５ｎｍ、２～２６ｎｍ、２～２７ｎｍ、２～２８ｎｍ、２～２９ｎｍ、２～３０ｎｍ、３～４ｎｍ、３～５ｎｍ、３～６ｎｍ、３～７ｎｍ、３～８ｎｍ、３～９ｎｍ、３～１０ｎｍ、３～１１ｎｍ、３～１２ｎｍ、３～１３ｎｍ、３～１４ｎｍ、３～１５ｎｍ、３～１６ｎｍ、３～１７ｎｍ、３～１８ｎｍ、３～１９ｎｍ、３～２０ｎｍ、３～２１ｎｍ、３～２２ｎｍ、３～２３ｎｍ、３～２４ｎｍ、３～２５ｎｍ、３～２６ｎｍ、３～２７ｎｍ、３～２８ｎｍ、３～２９ｎｍ、３～３０ｎｍ、４～５ｎｍ、４～６ｎｍ、４～７ｎｍ、４～８ｎｍ、４～９ｎｍ、４～１０ｎｍ、４～１１ｎｍ、４～１２ｎｍ、４～１３ｎｍ、４～１４ｎｍ、４～１５ｎｍ、４～１６ｎｍ、４～１７ｎｍ、４～１８ｎｍ、４～１９ｎｍ、４～２０ｎｍ、４～２１ｎｍ、４～２２ｎｍ、４～２３ｎｍ、４～２４ｎｍ、４～２５ｎｍ、４～２６ｎｍ、４～２７ｎｍ、４～２８ｎｍ、４～２９ｎｍ、４～３０ｎｍ、５～６ｎｍ、５～７ｎｍ、５～８ｎｍ、５～９ｎｍ、５～１０ｎｍ、５～１１ｎｍ、５～１２ｎｍ、５～１３ｎｍ、５～１４ｎｍ、５～１５ｎｍ、５～１６ｎｍ、５～１７ｎｍ、５～１８ｎｍ、５～１９ｎｍ、５～２０ｎｍ、５～２１ｎｍ、５～２２ｎｍ、５～２３ｎｍ、５～２４ｎｍ、５～２５ｎｍ、５～２６ｎｍ、５～２７ｎｍ、５～２８ｎｍ、５～２９ｎｍ、５～３０ｎｍ、６～７ｎｍ、６～８ｎｍ、６～９ｎｍ、６～１０ｎｍ、６～１１ｎｍ、６～１２ｎｍ、６～１３ｎｍ、６～１４ｎｍ、６～１５ｎｍ、６～１６ｎｍ、６～１７ｎｍ、６～１８ｎｍ、６～１９ｎｍ、６～２０ｎｍ、６～２１ｎｍ、６～２２ｎｍ、６～２３ｎｍ、６～２４ｎｍ、６～２５ｎｍ、６～２６ｎｍ、６～２７ｎｍ、６～２８ｎｍ、６～２９ｎｍ、６～３０ｎｍ、７～８ｎｍ、７～９ｎｍ、７～１０ｎｍ、７～１１ｎｍ、７～１２ｎｍ、７～１３ｎｍ、７～１４ｎｍ、７～１５ｎｍ、７～１６ｎｍ、７～１７ｎｍ、７～１８ｎｍ、７～１９ｎｍ、７～２０ｎｍ、７～２１ｎｍ、７～２２ｎｍ、７～２３ｎｍ、７～２４ｎｍ、７～２５ｎｍ、７～２６ｎｍ、７～２７ｎｍ、７～２８ｎｍ、７～２９ｎｍ、７～３０ｎｍ、８～９ｎｍ、８～１０ｎｍ、８～１１ｎｍ、８～１２ｎｍ、８～１３ｎｍ、８～１４ｎｍ、８～１５ｎｍ、８～１６ｎｍ、８～１７ｎｍ、８～１８ｎｍ、８～１９ｎｍ、８～２０ｎｍ、８～２１ｎｍ、８～２２ｎｍ、８～２３ｎｍ、８～２４ｎｍ、８～２５ｎｍ、８～２６ｎｍ、８～２７ｎｍ、８～２８ｎｍ、８～２９ｎｍ、８～３０ｎｍ、９～１０ｎｍ、９～１１ｎｍ、９～１２ｎｍ、９～１３ｎｍ、９～１４ｎｍ、９～１５ｎｍ、９～１６ｎｍ、９～１７ｎｍ、９～１８ｎｍ、９～１９ｎｍ、９～２０ｎｍ、９～２１ｎｍ、９～２２ｎｍ、９～２３ｎｍ、９～２４ｎｍ、９～２５ｎｍ、９～２６ｎｍ、９～２７ｎｍ、９～２８ｎｍ、９～２９ｎｍ、９～３０ｎｍ、１０～１１ｎｍ、１０～１２ｎｍ、１０～１３ｎｍ、１０～１４ｎｍ、１０～１５ｎｍ、１０～１６ｎｍ、１０～１７ｎｍ、１０～１８ｎｍ、１０～１９ｎｍ、１０～２０ｎｍ、１０～２１ｎｍ、１０～２２ｎｍ、１０～２３ｎｍ、１０～２４ｎｍ、１０～２５ｎｍ、１０～２６ｎｍ、１０～２７ｎｍ、１０～２８ｎｍ、１０～２９ｎｍ、１０～３０ｎｍ、１１～１２ｎｍ、１１～１３ｎｍ、１１～１４ｎｍ、１１～１５ｎｍ、１１～１６ｎｍ、１１～１７ｎｍ、１１～１８ｎｍ、１１～１９ｎｍ、１１～２０ｎｍ、１１～２１ｎｍ、１１～２２ｎｍ、１１～２３ｎｍ、１１～２４ｎｍ、１１～２５ｎｍ、１１～２６ｎｍ、１１～２７ｎｍ、１１～２８ｎｍ、１１～２９ｎｍ、１１～３０ｎｍ、１２～１３ｎｍ、１２～１４ｎｍ、１２～１５ｎｍ、１２～１６ｎｍ、１２～１７ｎｍ、１２～１８ｎｍ、１２～１９ｎｍ、１２～２０ｎｍ、１２～２１ｎｍ、１２～２２ｎｍ、１２～２３ｎｍ、１２～２４ｎｍ、１２～２５ｎｍ、１２～２６ｎｍ、１２～２７ｎｍ、１２～２８ｎｍ、１２～２９ｎｍ、１２～３０ｎｍ、１３～１４ｎｍ、１３～１５ｎｍ、１３～１６ｎｍ、１３～１７ｎｍ、１３～１８ｎｍ、１３～１９ｎｍ、１３～２０ｎｍ、１３～２１ｎｍ、１３～２２ｎｍ、１３～２３ｎｍ、１３～２４ｎｍ、１３～２５ｎｍ、１３～２６ｎｍ、１３～２７ｎｍ、１３～２８ｎｍ、１３～２９ｎｍ、１３～３０ｎｍ、１

４～１５ｎｍ、１４～１６ｎｍ、１４～１７ｎｍ、１４～１８ｎｍ、１４～１９ｎｍ、１４～２０ｎｍ、１４～２１ｎｍ、１４～２２ｎｍ、１４～２３ｎｍ、１４～２４ｎｍ、１４～２５ｎｍ、１４～２６ｎｍ、１４～２７ｎｍ、１４～２８ｎｍ、１４～２９ｎｍ、１４～３０ｎｍ、１５～１６ｎｍ、１５～１７ｎｍ、１５～１８ｎｍ、１５～１９ｎｍ、１５～２０ｎｍ、１５～２１ｎｍ、１５～２２ｎｍ、１５～２３ｎｍ、１５～２４ｎｍ、１５～２５ｎｍ、１５～２６ｎｍ、１５～２７ｎｍ、１５～２８ｎｍ、１５～２９ｎｍ、１５～３０ｎｍ、１６～１７ｎｍ、１６～１８ｎｍ、１６～１９ｎｍ、１６～２０ｎｍ、１６～２１ｎｍ、１６～２２ｎｍ、１６～２３ｎｍ、１６～２４ｎｍ、１６～２５ｎｍ、１６～２６ｎｍ、１６～２７ｎｍ、１６～２８ｎｍ、１６～２９ｎｍ、１６～３０ｎｍ、１７～１８ｎｍ、１７～１９ｎｍ、１７～２０ｎｍ、１７～２１ｎｍ、１７～２２ｎｍ、１７～２３ｎｍ、１７～２４ｎｍ、１７～２５ｎｍ、１７～２６ｎｍ、１７～２７ｎｍ、１７～２８ｎｍ、１７～２９ｎｍ、１７～３０ｎｍ、１８～１９ｎｍ、１８～２０ｎｍ、１８～２１ｎｍ、１８～２２ｎｍ、１８～２３ｎｍ、１８～２４ｎｍ、１８～２５ｎｍ、１８～２６ｎｍ、１８～２７ｎｍ、１８～２８ｎｍ、１８～２９ｎｍ、１８～３０ｎｍ、１９～２０ｎｍ、１９～２１ｎｍ、１９～２２ｎｍ、１９～２３ｎｍ、１９～２４ｎｍ、１９～２５ｎｍ、１９～２６ｎｍ、１９～２７ｎｍ、１９～２８ｎｍ、１９～２９ｎｍ、１９～３０ｎｍ、２０～２１ｎｍ、２０～２２ｎｍ、２０～２３ｎｍ、２０～２４ｎｍ、２０～２５ｎｍ、２０～２６ｎｍ、２０～２７ｎｍ、２０～２８ｎｍ、２０～２９ｎｍ、２０～３０ｎｍ、２１～２１ｎｍ、２１～２２ｎｍ、２１～２３ｎｍ、２１～２４ｎｍ、２１～２５ｎｍ、２１～２６ｎｍ、２１～２７ｎｍ、２１～２８ｎｍ、２１～２９ｎｍ、２１～３０ｎｍ、２２～２３ｎｍ、２２～２４ｎｍ、２２～２５ｎｍ、２２～２６ｎｍ、２２～２７ｎｍ、２２～２８ｎｍ、２２～２９ｎｍ、２２～３０ｎｍ、２３～２４ｎｍ、２３～２５ｎｍ、２３～２６ｎｍ、２３～２７ｎｍ、２３～２８ｎｍ、２３～２９ｎｍ、２３～３０ｎｍ、２４～２５ｎｍ、２４～２６ｎｍ、２４～２７ｎｍ、２４～２８ｎｍ、２４～２９ｎｍ、２４～３０ｎｍ、２５～２６ｎｍ、２５～２７ｎｍ、２５～２８ｎｍ、２５～２９ｎｍ、２５～３０ｎｍ、２６～２７ｎｍ、２６～２８ｎｍ、２６～２９ｎｍ、２６～３０ｎｍ、２７～２８ｎｍ、２７～２９ｎｍ、２７～３０ｎｍ、２８～２９ｎｍ、２８～３０ｎｍ、または２９～３０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０４】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－３０ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－３５ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－４０ｎｍ、２５～５００ｎｍ＋／－４５ｎｍ、または２５～５００ｎｍ＋／－５０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０５】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ、２５～３５ｎｍ、２５～４０ｎｍ、２５～４５ｎｍ、２５～５０ｎｍ、２５～５５ｎｍ、２５～６０ｎｍ、２５～７０ｎｍ、２５～７５ｎｍ、２５～８０ｎｍ、２５～９０ｎｍ、２５～９５ｎｍ、２５～１００ｎｍ、２５～１２５ｎｍ、２５～１５０ｎｍ、２５～２００ｎｍ、２５～３００ｎｍ、２５～４００ｎｍ、３０～３５ｎｍ、３５～４０ｎｍ、３５～４５ｎｍ、３５～５０ｎｍ、３５～５５ｎｍ、３５～６０ｎｍ、３５～７０ｎｍ、３５～７５ｎｍ、３５～８０ｎｍ、３５～９０ｎｍ、３５～９５ｎｍ、３５～１００ｎｍ、３５～１２５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ、３５～２００ｎｍ、３５～３００ｎｍ、３５～４００、３５～５００ｎｍ、４０～４５ｎｍ、３５～５０ｎｍ、４５～５５ｎｍ、４５～６０ｎｍ、４５～７０ｎｍ、４５～７５ｎｍ、４５～８０ｎｍ、４５～９０ｎｍ、４５～９５ｎｍ、４５～１００ｎｍ、４５～１２５ｎｍ、４５～１５０ｎｍ、４５～２００ｎｍ、４５～３００ｎｍ、４５～４００、４５～５００ｎｍ、５０～５５ｎｍ、５０～６０ｎｍ、５０～７０ｎｍ、５０～７５ｎｍ、５０～８０ｎｍ、５０～９０ｎｍ、５０～９５ｎｍ、５０～１００ｎｍ、５０～１２５ｎｍ、５０～１５０ｎｍ、５０～２００ｎｍ、５０～３００ｎｍ、５０～４００、５０～５００ｎｍ、５５～６０ｎｍ、５５～７０ｎｍ、５５～７５ｎｍ、５５～８０ｎ

ｍ、５５～９０ｎｍ、５５～９５ｎｍ、５５～１００ｎｍ、５５～１２５ｎｍ、５５～１５０ｎｍ、５５～２００ｎｍ、５５～３００ｎｍ、５５～４００、５５～５００ｎｍ、６０～７０ｎｍ、６０～７５ｎｍ、６０～８０ｎｍ、６０～９０ｎｍ、６０～９５ｎｍ、６０～１００ｎｍ、６０～１２５ｎｍ、６０～１５０ｎｍ、６０～２００ｎｍ、６０～３００ｎｍ、６０～４００、６０～５００ｎｍ、６５～７０ｎｍ、６５～７５ｎｍ、６５～８０ｎｍ、６５～９０ｎｍ、６５～９５ｎｍ、６５～１００ｎｍ、６５～１２５ｎｍ、６５～１５０ｎｍ、６５～２００ｎｍ、６５～３００ｎｍ、６５～４００、６５～５００ｎｍ、７０～７５ｎｍ、７０～８０ｎｍ、７０～９０ｎｍ、７０～９５ｎｍ、７０～１００ｎｍ、７０～１２５ｎｍ、７０～１５０ｎｍ、７０～２００ｎｍ、７０～３００ｎｍ、７０～４００、７０～５００ｎｍ、７５～８０ｎｍ、７５～９０ｎｍ、７５～９５ｎｍ、７５～１００ｎｍ、７５～１２５ｎｍ、７５～１５０ｎｍ、７５～２００ｎｍ、７５～３００ｎｍ、７５～４００、７５～５００ｎｍ、８０～９０ｎｍ、８０～９５ｎｍ、８０～１００ｎｍ、８０～１２５ｎｍ、８０～１５０ｎｍ、８０～２００ｎｍ、８０～３００ｎｍ、８０～４００、８０～５００ｎｍ、８５～９０ｎｍ、８５～９５ｎｍ、８５～１００ｎｍ、８５～１２５ｎｍ、８５～１５０ｎｍ、８５～２００ｎｍ、８５～３００ｎｍ、８５～４００、８５～５００ｎｍ、９０～９５ｎｍ、９０～１００ｎｍ、９０～１２５ｎｍ、９０～１５０ｎｍ、９０～２００ｎｍ、９０～３００ｎｍ、９０～４００、９０～５００ｎｍ、１００～１２５ｎｍ、１００～１５０ｎｍ、１００～２００ｎｍ、１００～３００ｎｍ、１００～４００、１００～５００ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ、１２５～２００ｎｍ、１２５～３００ｎｍ、１２５～４００、１２５～５００ｎｍ、１５０～２００ｎｍ、１５０～３００ｎｍ、１５０～４００、１５０～５００ｎｍ、１７５～２００ｎｍ、１７５～３００ｎｍ、１７５～４００、１７５～５００ｎｍ、２００～３００ｎｍ、２００～４００、２００～５００ｎｍ、３００～４００、３００～５００ｎｍ、または４００～５００ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～３５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～４０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～４５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～５５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～６０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２５～４００ｎｍ＋／－５ｎｍ、３０～３５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～４０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～４５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～５５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～６０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～４００、３５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、４０～４５ｎｍ＋／－５ｎｍ、３５～５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～５５ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～６０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、４５～４００、４５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～５５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～６０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５０～４００、５０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～６０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～８０ｎｍ＋／－

５ｎｍ、５５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、５５～４００、５５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６０～４００、６０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～７０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、６５～４００、６５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～７５ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７０～４００、７０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～８０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、７５～４００、７５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８０～４００、８０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～９０ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、８５～４００、８５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～９５ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～１００ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、９０～４００、９０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１００～１２５ｎｍ＋／－５ｎｍ、１００～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、１００～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１００～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１００～４００、１００～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ＋／－５ｎｍ、１２５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１２５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１２５～４００、１２５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１５０～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１５０～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１５０～４００、１５０～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１７５～２００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１７５～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、１７５～４００、１７５～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２００～３００ｎｍ＋／－５ｎｍ、２００～４００、２００～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、３００～４００、３００～５００ｎｍ＋／－５ｎｍ、または４００～５００ｎｍ＋／－５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～３５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～４０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～４５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～１０５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～６０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２５～４００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３０～３５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～４０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～４５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～１０５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～６０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－１０ｎ

m、３５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～４００、３５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４０～４５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～１０５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～６０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、４５～４００、４５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～１０５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～６０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５０～４００、５０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～６０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、５５～４００、５５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６０～４００、６０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～７０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、６５～４００、６５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～７５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７０～４００、７０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～８０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、７５～４００、７５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８０～４００、８０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～９０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、８５～４００、８５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～９５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～１００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、９０～４００、９０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１００～１２５ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１００～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１００～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１００～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１００～４００、１００～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１２５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１２５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１２５～４００、１２５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１５０～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１５０～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１５

０～４００、１５０～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１７５～２００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１７５～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、１７５～４００、１７５～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２００～３００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、２００～４００、２００～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、３００～４００、３００～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍ、または４００～１０００ｎｍ＋／－１０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～３５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～４０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～４５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～１５５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～６０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２５～４００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３０～３５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～４０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～４５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１５５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～６０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～４００、３５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４０～４５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～１５５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～６０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、４５～４００、４５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～１５５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～６０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５０～４００、５０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～６０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、５５～４００、５５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６０～４００、６０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～７０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、６５～４００、６５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～７５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７０～４００、７０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～８０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～９０ｎｍ＋

／－１５ｎｍ、７５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、７５～４００、７５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８０～４００、８０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～９０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、８５～４００、８５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～９５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～１００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、９０～４００、９０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１００～１２５ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１００～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１００～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１００～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１００～４００、１００～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１２５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１２５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１２５～４００、１２５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１５０～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１５０～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１５０～４００、１５０～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１７５～２００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１７５～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、１７５～４００、１７５～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２００～３００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、２００～４００、２００～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、３００～４００、３００～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍ、または４００～１５００ｎｍ＋／－１５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１０９】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～３５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～４０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～４５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～２０５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～６０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２５～４００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３０～３５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～４０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～４５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～２０５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～６０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～４００、３５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４０～４５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～２０５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～６０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、４５～４００、４５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～２０５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～６０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５０～４００、５０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～６０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～７

０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、５５～４００、５５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６０～４００、６０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～７０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、６５～４００、６５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～７５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７０～４００、７０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～８０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、７５～４００、７５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８０～４００、８０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～９０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、８５～４００、８５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～９５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～１００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、９０～４００、９０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１００～１２５ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１００～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１００～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１００～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１００～４００、１００～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１２５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１２５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１２５～４００、１２５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１５０～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１５０～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１５０～４００、１５０～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１７５～２００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１７５～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、１７５～４００、１７５～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２００～３００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、２００～４００、２００～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、３００～４００、３００～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍ、または４００～２０００ｎｍ＋／－２０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５～３０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～３５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～４０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～４５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～２５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～２５５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～６０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２５～４００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３０～３５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～４０ｎ

m＋／－２５ｎｍ、３５～４５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～２５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～２５５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～６０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～４００、３５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４０～４５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３５～２５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～２５５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～６０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、４５～４００、４５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～２５５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～６０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５０～４００、５０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～６０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、５５～４００、５５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６０～４００、６０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～７０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、６５～４００、６５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～７５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７０～４００、７０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～８０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、７５～４００、７５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８０～４００、８０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～９０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、８５～４００、８５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～９５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～１００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、９０～４００、９０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１００～１２５ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１００～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１００～２００ｎｍ＋／－２

５ｎｍ、１００～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１００～４００、１００～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１２５～１５０ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１２５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１２５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１２５～４００、１２５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１５０～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１５０～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１５０～４００、１５０～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１７５～２００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１７５～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、１７５～４００、１７５～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２００～３００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、２００～４００、２００～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、３００～４００、３００～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍ、または４００～２５００ｎｍ＋／－２５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２４、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、５０＋／－５ｎｍ、７５＋／－５ｎｍ、１００＋／－５ｎｍ、１２５＋／－５ｎｍ、１５０＋／－５ｎｍ、１７５＋／－５ｎｍ、２００＋／－５ｎｍ、２２５＋／－５ｎｍ、２５０＋／－５ｎｍ、２７５＋／－５ｎｍ、３００＋／－５ｎｍ、３２５＋／－５ｎｍ、３５０＋／－５ｎｍ、３７５＋／－５ｎｍ、４００＋／－５ｎｍ、４２５＋／－５ｎｍ、４５０＋／－５ｎｍ、４７５＋／－５ｎｍ、または５００＋／－５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１３】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、５０＋／－１０ｎｍ、７５＋／－１０ｎｍ、１００＋／－１０ｎｍ、１２５＋／－１０ｎｍ、１５０＋／－１０ｎｍ、１７５＋／－１０ｎｍ、２００＋／－１０ｎｍ、２２５＋／－１０ｎｍ、２５０＋／－１０ｎｍ、２７５＋／－１０ｎｍ、３００＋／－１０ｎｍ、３２５＋／－１０ｎｍ、３５０＋／－１０ｎｍ、３７５＋／－１０ｎｍ、４００＋／－１０ｎｍ、４２５＋／－１０ｎｍ、４５０＋／－１０ｎｍ、４７５＋／－１０ｎｍ、または５００＋／－１０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１４】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、５０＋／－１５ｎｍ、７５＋／－１５ｎｍ、１００＋／－１５ｎｍ、１２５＋／－１５ｎｍ、１５０＋／－１５ｎｍ、１７５＋／－１５ｎｍ、２００＋／－１５ｎｍ、２２５＋／－１５ｎｍ、２５０＋／－１５ｎｍ、２７５＋／－１５ｎｍ、３００＋／－１５ｎｍ、３２５＋／－１５ｎｍ、３５０＋／－１５ｎｍ、３７５＋／－１５ｎｍ、４００＋／－１５ｎｍ、４２５＋／－１５ｎｍ、４５０＋／－１５ｎｍ、４７５＋／－１５ｎｍ、または５００＋／－１５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、５０＋／－２０ｎｍ、７５＋／－２０ｎｍ、１００＋／－２０ｎｍ、１２５＋／－２０ｎｍ、１５０＋／－２０ｎｍ、１７５＋／－２０ｎｍ、２００＋／－２０ｎｍ、２２５＋／－２０ｎｍ、２５０＋／－２０ｎｍ、２７５＋／－２０ｎｍ、３００＋／－２０ｎｍ、３２５＋／－２０ｎｍ、３５０＋／－２０ｎｍ、３７５＋／－２０ｎｍ、４００＋／－２０ｎｍ、４２５＋／－２０ｎｍ、４５０＋／－２０ｎｍ、４７５＋／－２０ｎｍ、または５００＋／－２０ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、５０＋／－２５ｎｍ、７５＋／－２５ｎｍ、１００＋／－２５ｎｍ、１２５＋／－２５ｎｍ、１５０＋／－２５ｎｍ、１７５＋／－２５ｎｍ、２００＋／－２５ｎｍ、２２５＋／－２５ｎｍ、２５０＋／－２５ｎｍ、２７５＋／－２５ｎｍ、３００＋／－２５ｎｍ、３２５＋／－２５ｎｍ、３５０＋／－２５ｎｍ、３７５＋／－２５ｎｍ、４００＋／－２５ｎｍ、４２５＋／－２５ｎｍ、４５０＋／

－２５ｎｍ、４７５＋／－２５ｎｍ、または５００＋／－２５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１７】

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、または１２５ｎｍの平均粒径を有する。

【０１１８】

量子ドット

いくつかの実施形態において、ナノ粒子は量子ドットである。量子ドットは、電磁エネルギーに曝露されるときにそれらが今度はエネルギーを放出するようなバルク半導体と同等の性質を有する別々のナノ粒子である。量子ドットは、サイズ及び組成における変化によって、赤外域、可視スペクトル、及び紫外域においてでさえエネルギーに敏感であるように操作され得る。さらに、それらは、光またはエネルギーのいずれかそれぞれを生成する光輝性または光起電性のいずれかであるように設計され得る。

【０１１９】

コロイド状半導体量子ドットは、典型的には、溶液に溶解した前駆体化合物から合成され、前駆体、有機界面活性剤、及び溶媒を含む３つの構成要素系に基づくことが多い。典型的な過程において、反応培地を所望の温度に加熱すると同時に、前駆体はモノマーへと化学的に変化する。一旦、モノマーが十分に高い過飽和レベルに達すると、量子ドット成長は核形成過程を介して始まる。成長過程の間の温度は、量子ドット成長の最適な条件を判定することにおける要因のうちの１つである。一般的には、温度は、合成過程の間の原子の転位及びアニーリングを可能にするのに十分高くなければならない。しかしながら、温度は結晶成長を阻害するために高すぎる温度であるべきではない。量子ドット成長過程の間に制御されることも良くある追加の要因はモノマー濃度である。量子ドットの成長過程は２つの異なるレジームにおいて起こることが良くあり、それらは「フォーカシング」及び「デフォーカシング」である。高モノマー濃度では、臨界サイズ（量子ドットが成長も縮小もしないサイズ）は非常に狭く、ほとんど全ての粒子の成長をもたらす。このレジームにおいて、成長の相対比率はより小さな粒子の成長を支持し、それは、「フォーカス」を提供し、粒子サイズに対して高い度合の単分散度を提供する。サイズフォーカシングは、モノマー濃度が、提示の平均量子ドットサイズが臨界サイズよりも常に少し大きいように保持されるときに最適であると考えられる。モノマー濃度が成長の間に激減すると、臨界サイズは提示の平均サイズより大きくなり、分布はオストワルド熟成として既知の過程の結果、「デフォーカス」する。

【０１２０】

多くの異なる半導体二元及び三元量子ドットを生成するためにコロイド法が存在する。コロイド法によって生成される量子ドットの例としては、セレン化カドミウム（ＣｄＳｅ）、硫化カドミウム（ＣｄＳ）、ヒ化インジウム（ＩｎＡｓ）、及びリン化インジウム（ＩｎＰ）硫化カドミウムーテルル（ＣｄＴｅＳ）が挙げられるが、これらに限定されない。量子ドットを含む原子の数は、典型的には２～２０ｎｍの範囲の直径を伴い（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２．５、３．５、４．５、５．５、６．５、７．５、８．５、９．５、１０．５、１１．５、１２．５、１３．５、１４．５、１５．５、１６．５、１７．５、１８．５、１９．５、２０．５、２～３ｎｍ、２～４、２～５、２～６、２～７、２～８、２～９、２～１０、２～１１、２～１２、２～１３、２～１４、２～１５、２～１６

、２～１７、２～１８、２～１９、２～２０、３～４、３～５、３～６、３～７、３～８、３～９、３～１０、３～１１、３～１２、３～１３、３～１４、３～１５、３～１６、３～１７、３～１８、３～１９、３～２０、４～５、４～６、４～７、４～８、４～９、４～１０、４～１１、４～１２、４～１３、４～１４、４～１５、４～１６、４～１７、４～１８、４～１９、４～２０、５～６、５～７、５～８、５～９、５～１０、５～１１、５～１２、５～１３、５～１４、５～１５、５～１６、５～１７、５～１８、５～１９、５～２０、６～７、６～８、６～９、６～１０、６～１１、６～１２、６～１３、６～１４、６～１５、６～１６、６～１７、６～１８、６～１９、６～２０、７～８、７～９、７～１０、７～１１、７～１２、７～１３、７～１４、７～１５、７～１６、７～１７、７～１８、７～１９、７～２０、８～９、８～１０、８～１１、８～１２、８～１３、８～１４、８～１５、８～１６、８～１７、８～１８、８～１９、８～２０、９～１０、９～１１、９～１２、９～１３、９～１４、９～１５、９～１６、９～１７、９～１８、９～１９、９～２０、１０～１１、１０～１２、１０～１３、１０～１４、１０～１５、１０～１６、１０～１７、１０～１８、１０～１９、１０～２０、１１～１２、１１～１３、１１～１４、１１～１５、１１～１６、１１～１７、１１～１８、１１～１９、１１～２０、１２～１３、１２～１４、１２～１５、１２～１６、１２～１７、１２～１８、１２～１９、１２～２０、１３～１４、１３～１５、１３～１６、１３～１７、１３～１８、１３～１９、１３～２０、１４～１５、１４～１６、１４～１７、１４～１８、１４～１９、１４～２０、１５～１６、１５～１７、１５～１８、１５～１９、１５～２０、１６～１７、１６～１８、１６～１９、１６～２０、１７～１８、１７～１９、１７～２０、１８～１９、１８～２０、１９～２０ｎｍ）、１００～１００，０００個の範囲であり得る。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、量子ドット材料は、炭素、コロイド金、ゲルマニウム、ヒ化インジウム、アンチモン化インジウム、ヒ化ガリウム、窒化ガリウム、カドミウム／セレン／テルル化合物、鉛、酸化鉛、硫化鉛、セレン化鉛、リン化インジウムガリウム、ケイ素、コロイド銀、テルル化水銀カドミウム、鉄、酸化鉄、コバルト、グラフェン、ランタン、セリウム、ストロンチウム、炭酸塩、マンガン、酸化マンガン、酸化ニッケル、白金、リチウム、チタン酸リチウム、タンタル、銅、パラジウム、モリブデン、炭化ホウ素、炭化ケイ素、炭化チタン、酸化タングステン、アルミニウム、ニオブ、ツリウム、窒化アルミニウム、スズ、酸化アルミニウム、酸化スズ、アンチモン、ジスプロシウム、パセオジニウム（ｐａｓｅｏｄｙｎｉｕｍ）、酸化アンチンモニー（ａｎｔｉｎｍｏｎｙ　ｏｘｉｄｅ）、エルビウム、レニウム、バリウム、ルテニウム、ベリリウム、サマリウム、酸化ビスマス、ホウ素、ガドリニウム、窒化ホウ素、酸化バナジウム、ストロンチウム、イッテルビウム、ジルコニウム、ダイアモンド（Ｃ）、ケイ素（Ｓｉ）、ゲルマニウム（Ｇｅ）、炭化ケイ素（ＳｉＣ）、ケイ素－ゲルマニウム（ＳｉＧｅ）、アンチモン化アルミニウム（ＡｌＳｂ）、ヒ化アルミニウム（ＡｌＡｓ）、窒化アルミニウム（ＡｌＮ）、リン化アルミニウム（ＡｌＰ）、窒化ホウ素（ＢＮ）、リン化ホウ素（ＢＰ）、ヒ化ホウ素（ＢＡｓ）、アンチモン化ガリウム（ＧａＳｂ）、ヒ化ガリウム（ＧａＡｓ）、窒化ガリウム（ＧａＮ）、リン化ガリウム（ＧａＰ）、アンチモン化インジウム（ＩｎＳｂ）、ヒ化インジウム（ＩｎＡｓ）、窒化インジウム（ＩｎＮ）、リン化インジウム（ＩｎＰ）、ヒ化アルミニウムガリウム（ＡｌＧａＡｓ、$Al_xGa_{1-x}As$）、ヒ化インジウムガリウム（ＩｎＧａＡｓ、$In_xGa_{1-x}As$）、リン化インジウムガリウム（ＩｎＧａＰ）、ヒ化アルミニウムインジウム（ＡｌＩｎＡｓ）、アンチモン化アルミニウムインジウム（ＡｌＩｎＳｂ）、窒化ヒ化ガリウム（ＧａＡｓＮ）、リン化ヒ化ガリウム（ＧａＡｓＰ）、窒化アルミニウムガリウム（ＡｌＧａＮ）、リン化アルミニウムガリウム（ＡｌＧａＰ）、窒化インジウムガリウム（ＩｎＧａＮ）、アンチモン化ヒ化インジウム（ＩｎＡｓＳｂ）、アンチモン化インジウムガリウム（ＩｎＧａＳｂ）、リン化アルミニウムガリウムインジウム（ＡｌＧａＩｎＰ、またＩｎＡｌＧａＰ、ＩｎＧａＡｌＰ、ＡｌＩｎＧａＰ）、リン化ヒ化アルミニウムガリウム（ＡｌＧａＡｓＰ）、リン化ヒ化インジウ

ムガリウム（ＩｎＧａＡｓＰ）、リン化ヒ化アルミニウムインジウム（ＡｌＩｎＡｓＰ）、窒化ヒ化アルミニウムガリウム（ＡｌＧａＡｓＮ）、窒化ヒ化インジウムガリウム（ＩｎＧａＡｓＮ）、窒化ヒ化インジウムアルミニウム（ＩｎＡｌＡｓＮ）、窒化アンチモン化ヒ化ガリウム（ＧａＡｓＳｂＮ）、アンチモン化ヒ化窒化ガリウムインジウム（ＧａＩｎＮＡｓＳｂ）、リン化アンチモン化ヒ化ガリウムインジウム（ＧａＩｎＡｓＳｂＰ）、セレン化カドミウム（ＣｄＳｅ）、硫化カドミウム（ＣｄＳ）、テルル化カドミウム（ＣｄＴｅ）、酸化亜鉛（ＺｎＯ）、セレン化亜鉛（ＺｎＳｅ）、硫化亜鉛（ＺｎＳ）、テルル化亜鉛（ＺｎＴｅ）テルル化カドミウム亜鉛（ＣｄＺｎＴｅ、「ＣＺＴ」）、テルル化水銀カドミウム（ＨｇＣｄＴｅ）、テルル化水銀亜鉛（ＨｇＺｎＴｅ）、セレン化水銀亜鉛（ＨｇＺｎＳｅ）、塩化第一銅（ＣｕＣｌ）、セレン化鉛（ＰｂＳｅ）、硫化鉛（ＰｂＳ）、テルル化鉛（ＰｂＴｅ）、硫化スズ（ＳｎＳ）、テルル化スズ（ＳｎＴｅ）、テルル化鉛スズ（ＰｂＳｎＴｅ）、テルル化タリウムスズ（$Tl_2SnTe_5$）、テルル化タリウムゲルマニウム（$Tl_2GeTe_5$）、テルル化ビスマス（$Bi_2Te_3$）、リン化カドミウム（$Cd_3P_2$）、ヒ化カドミウム（$Cd_3As_2$）、アンチモン化カドミウム（$Cd_3Sb_2$）、リン化亜鉛（$Zn_3P_2$）、ヒ化亜鉛（$Zn_3As_2$）、アンチモン化亜鉛（$Zn_3Sb_2$）、ヨウ化鉛（ＩＩ）（$PbI_2$）、二硫化モリブデン（$MoS_2$）、セレン化ガリウム（ＧａＳｅ）、硫化スズ（ＳｎＳ）、硫化ビスマス（$Bi_2S_3$）、セレン化銅インジウムガリウム（ＣＩＧＳ）、ケイ化白金（ＰｔＳｉ）、ヨウ化ビスマス（ＩＩＩ）（$BiI_3$）、ヨウ化水銀（ＩＩ）（$HgI_2$）、臭化タリウム（Ｉ）（ＴｌＢｒ）、二酸化チタン：アナターゼ（$TiO_2$）、酸化銅（Ｉ）（$Cu_2O$）、酸化銅（ＩＩ）（ＣｕＯ）、二酸化ウラニウム（$UO_2$）、三酸化ウラニウム（$UO_3$）などを含むが、これらに限定されない。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、本発明の量子ドットに好適な材料は、ペンタセン、アントラセン、及びルブレンを含む有機半導体を含む。いくつかの実施形態において、本発明の量子ドットに好適な材料は、マンガン－ドープヒ化インジウム及びヒ化ガリウム、マンガン－ドープアンチモン化インジウム、マンガン－及び鉄－ドープ酸化インジウム、マンガンドープ酸化亜鉛、ならびにクロムドープ窒化アルミニウム、鉄－ドープ二酸化スズ、ｎ－型コバルト－ドープ酸化亜鉛、コバルト－ドープ二酸化チタン（ルチル及びアナターゼ両方）、クロム－ドープルチル、鉄－ドープルチル及び鉄－ドープアナターゼ、ニッケル－ドープアナターゼ、ならびにマンガン－ドープ二酸化スズなどの磁性半導体を含む。

【０１２３】

量子ドットは様々な技法を使用して形成され得る。例えば、量子ドットは、第１のバンドギャップより大きい第２のバンドギャップの第２の材料によって包囲される第１のバンドギャップを有する第１の材料の領域を作り出すことによって形成され得る。かかる過程によって生成される例示的な量子ドットは、セレン化亜鉛（ＺｎＳ）シェルによって包囲されるセレン化カドミウム（ＣｄＳｅ）コアを含むが、これに限定されない。

【０１２４】

代替的には、自己形成量子ドットは、材料が格子整合しない基質上で成長するとき、分子線エピタキシー（ＭＢＥ）及び有機金属気相エピタキシー（ＭＯＶＰＥ）の間の一定の条件下で自発的に核形成する。成長した層と基質との間の結果として生じる歪みは、二次元「湿潤層」の上部上に首尾一貫して歪んだアイランドを生成する。アイランドはシェルによってその後包囲されて、量子ドットを形成し得る。

【０１２５】

個別の量子ドットはまた、遠隔でドープされた量子井戸または半導体ヘテロ構造中に存在する二次元電子または正孔ガスから生成され得る。この場合、表面は光レジストの薄層でコーティングされる。次いで、側方パターンは電子ビームリソグラフィーによってレジスト中に画定される。次いで、このパターンは、エッチングによって、または電子ガスと電極との間の外部電圧の印加を可能にする金属電極を沈着すること（リフトオフ法）によって電子または正孔ガスに移行され得る。

【０１２６】
量子ドットはまた、井戸の厚さにおける単層変動のため、量子井戸構造において形成され得る。代替的には、量子ドットは、超音波エアロゾル熱分解（ＵＡＰ）によって生成され得る。
【０１２７】
いくつかの実施形態において、量子ドットは、例えば、インジウム／ガリウム／リン化物、ケイ素、ヒ化ガリウム、テルル化カドミウム、セレン化銅インジウムガリウム、窒化インジウムガリウム、炭素、コロイド金、コロイド銀、または有機材料、例えば、ポリマー－フラーレンヘテロ接合（例えば、Ｐ３ＨＴ＋Ｃ６０）、有機ナノ結晶太陽電池（例えば、セレン化カドミウムまたはテルル化カドミウム）、色素増感電池（例えば、色素及び酸化チタンまたは酸化ノーベリウム）、またはタンデム電池（例えば、銅－フタロシアニン＋Ｃ６０）から形成される内部半導体コアと、例えば、セレン化亜鉛または他の好適な材料から形成されるシェルと、例えば、ＰＥＧ脂質または他の好適な材料から形成されるコーティングと、例えば、ビオチン、ストレプトアビジン、接着タンパク質、ビタミン、有機及び無機化合物、炭水化物、アプタマー、アミノ酸、脂質、ヒアルロン酸、または他の好適なタンパク質から形成される生体機能材料と、を含む。
【０１２８】
抗原提示複合体
抗原提示複合体は抗原結合間隙を含み、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆体への提示のため抗原と結合し得る。抗原提示複合体は、例えば、ＭＨＣクラスＩもしくはクラスＩＩ分子、ＭＨＣクラスＩもしくはクラスＩＩ分子の機能抗原結合間隙を含む融合タンパク質、ＭＨＣクラスＩもしくはクラスＩＩ「分子複合体」（以下に記載）、またはＣＤ１ファミリー（例えば、ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｄ、及びＣＤ１ｅ）のメンバーなどの非古典的なＭＨＣ様分子であり得る。
【０１２９】
いくつかの実施形態において、抗原提示複合体はＭＨＣクラスＩ及び／またはＭＨＣクラスＩＩ分子複合体である。ＭＨＣクラスＩ及びクラスＩＩ分子複合体はいくつかの有用な特徴を有する。例えば、それらは、免疫グロブリン骨格によって提供される安定性及び分泌効率に基づいて、非常に安定しており、生成するのが容易である。さらに、免疫グロブリンのＦｃ部分を変更することによって、異なる生物学的機能が、Ｆｃ部分によって産出される生物学的機能に基づいて、分子に提供され得る。１種類の免疫グロブリン遺伝子のＦｃ部分の、別のものへの置換は当該技術分野内である。
【０１３０】
「ＭＨＣクラスＩ分子複合体」は米国特許第６，２６８，４１１号に記載される。ＭＨＣクラスＩ分子複合体は、免疫グロブリン重鎖の末端で立体構造的に未変化の様式で形成される（概略図については米国特許第６，２６８，４１１号の図１Ａを参照されたい）。抗原ペプチドが結合するＭＨＣクラスＩ分子複合体は、抗原特異的リンパ球受容体（例えば、Ｔ細胞受容体）に安定して結合され得る。
【０１３１】
ＭＨＣクラスＩ分子複合体は少なくとも２つの融合タンパク質を含む。第１の融合タンパク質は、第１のＭＨＣクラスＩα鎖及び第１の免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質は、第２のＭＨＣクラスＩα鎖及び第２の免疫グロブリン重鎖を含む。第１及び第２の免疫グロブリン重鎖は会合して、２つのＭＨＣクラスＩペプチド結合間隙を含むＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成する。免疫グロブリン重鎖は、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ３、ＩｇＧ２β、ＩｇＧ２α、ＩｇＥ、またはＩｇＡの重鎖であり得る。好ましくは、ＩｇＧ重鎖を使用して、ＭＨＣクラスＩ分子複合体を形成する。多価ＭＨＣクラスＩ分子複合体が所望される場合、ＩｇＭまたはＩｇＡ重鎖を使用して、五価または四価分子それぞれを提供し得る。他の価数を有するＭＨＣクラスＩ分子複合体もまた、複数の免疫グロブリン重鎖を使用して、構築され得る。ＭＨＣクラスＩ分子複合体の構築は米国特許第６，２６８，４１１号に詳細が記載される。

【０１３２】
「ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体」は、米国特許第６，４５８，３５４号、米国特許第６，０１５，８８４号、米国特許第６，１４０，１１３号、及び米国特許第６，４４８，０７１号に記載される。ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体は少なくとも４つの融合タンパク質を含む。２つの第１の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメインと、を含む。２つの第２の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリンκまたはλ軽鎖と、（ｉｉ）ＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインと、を含む。２つの第１の融合タンパク質及び２つの第２の融合タンパク質は会合して、ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体を形成する。各第１の融合タンパク質のＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質のＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインは、ＭＨＣクラスＩＩペプチド結合間隙を形成する。

【０１３３】
免疫グロブリン重鎖は、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ３、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２β、ＩｇＧ２α、ＩｇＥ、またはＩｇＡの重鎖であり得る。好ましくは、ＩｇＧ１重鎖を使用して、２つの抗原結合間隙を含む二価分子複合体を形成する。任意選択で、重鎖の可変領域が含まれ得る。ＩｇＭまたはＩｇＡ重鎖を使用して、五価または四価分子複合体それぞれを提供し得る。他の価数を有する分子複合体もまた、複数の免疫グロブリン鎖を使用して、構築され得る。

【０１３４】
ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体の融合タンパク質は、免疫グロブリン鎖とＭＨＣクラスＩＩポリペプチドの細胞外ドメインとの間に挿入されるペプチドリンカーを含み得る。リンカー配列の長さは、抗原結合及び受容体架橋の度合を調節するために必要な柔軟性によって変化し得る。構築物はまた、細胞外ドメインＭＨＣクラスＩＩポリペプチドが、追加のリンカー領域無しに、免疫グロブリン分子に直接及び共有結合的に付着するように設計され得る。

【０１３５】
リンカー領域が含まれる場合、この領域は、好ましくは、少なくとも３個及び３０個以下のアミノ酸を含有する。より好ましくは、リンカーは約５個及び２０個以下のアミノ酸であり、最も好ましくは、リンカーは１０個未満のアミノ酸である。一般的には、リンカーは短いグリシン／セリンスペーサーからなり、任意のアミノ酸が使用され得る。免疫グロブリン重鎖をＭＨＣクラスＩＩβ鎖の細胞外ドメインに接続するために好ましいリンカーは、ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＴＨＲ－ＳＥＲ－ＧＬＹ（配列番号１）である。免疫グロブリン軽鎖をＭＨＣクラスＩＩα鎖の細胞外ドメインに接続するために好ましいリンカーは、ＧＬＹ－ＳＥＲ－ＬＥＵ－ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＳＥＲ（配列番号２）である。

【０１３６】
Ｔ細胞に影響する分子
「Ｔ細胞に影響する分子」は、前駆Ｔ細胞または抗原特異的Ｔ細胞に生物学的影響を有する分子である。かかる生物学的影響は、例えば、前駆Ｔ細胞のＣＴＬ、ヘルパーＴ細胞（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２）、または制御性Ｔ細胞への分化、Ｔ細胞の増殖、及びＴ細胞アポトーシスの誘導を含む。したがって、Ｔ細胞に影響する分子は、Ｔ細胞共刺激分子、接着分子、Ｔ細胞成長因子、制御性Ｔ細胞インデューサー分子、及びアポトーシス誘導分子を含む。いくつかの実施形態において、ナノａＡＰＣは少なくとも１つのかかる分子を含み、任意選択で、ナノａＡＰＣは任意の組み合わせにおける少なくとも２つ、３つ、または４つのかかる分子を含む。

【０１３７】
Ｔ細胞共刺激分子は抗原特異的Ｔ細胞の活性化に貢献する。かかる分子は、ＣＤ２８（抗体を含む）、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、Ｂ７－Ｈ３、４－１ＢＢＬ、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ１３４（ＯＸ－４０Ｌ）、Ｂ７ｈ（Ｂ７ＲＰ－１）、ＣＤ４０、ＬＩＧＨＴに特異的に結合する分子、ＨＶＥＭに特異的に結合する抗体、ＣＤ４０Ｌに特異的に結合する抗体、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体、４－１ＢＢに特異的に結

合する抗体を含むが、これらに限定されない。

【０１３８】

ナノａＡＰＣに有用な接着分子を使用して、ナノａＡＰＣのＴ細胞との、またはＴ細胞前駆体との接着を媒介し得る。有用な接着分子は、例えば、ＩＣＡＭ－１及びＬＦＡ－３を含む。

【０１３９】

Ｔ細胞成長因子はＴ細胞の増殖及び／または分化に影響する。Ｔ細胞成長因子の例としては、サイトカイン（例えば、インターロイキン、インターフェロン）及び超抗原が挙げられる。所望される場合、サイトカインは、融合タンパク質を含む分子複合体中に存在し得る。一実施形態において、サイトカイン分子複合体は少なくとも２つの融合タンパク質を含み得、第１の融合タンパク質が、第１のサイトカイン及び免疫グロブリン重鎖を含み、第２の融合タンパク質が、第２のサイトカイン及び第２の免疫グロブリン重鎖を含む。第１及び第２の免疫グロブリン重鎖が会合して、サイトカイン分子複合体を形成する。別の実施形態において、サイトカイン分子複合体は少なくとも４つの融合タンパク質を含み、２つの第１の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）第１のサイトカインと、を含み、２つの第２の融合タンパク質が、（ｉ）免疫グロブリン軽鎖と、（ｉｉ）第２のサイトカインと、を含む。２つの第１の融合タンパク質及び２つの第２の融合タンパク質が会合して、サイトカイン分子複合体を形成する。サイトカイン分子複合体のいずれかの種類における第１及び第２のサイトカインは同一であるか、または異なり得る。特に有用なサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びγインターフェロンを含む。

【０１４０】

超抗原は強力なＴ細胞分裂促進因子である。超抗原は、クラスＩＩ主要組織適合（ＭＨＣ）分子に最初に結合することによって、次いで、Ｔ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）へのＶβ－特異的方式での二元複合体結合として、Ｔ細胞有糸分裂誘発を刺激する。超抗原は、細菌性腸毒素、例えば、ブドウ球菌腸毒素（例えば、米国特許第５，８５９，２０７号に記載されるＳＥＡ及びその活性化タンパク質、ＳＥＢ、ＳＥＣ、ＳＥＤ、及びＳＥＥレトロウイルス超抗原（米国特許第５，５１９，１１４号に記載）、化膿性連鎖球菌外毒素（ＳＰＥ）、黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素（ＴＳＳＴ－１）、連鎖球菌分裂促進的外毒素（ＳＭＥ）、及び連鎖球菌超抗原（ＳＳＡ）（ＵＳ２００３／００３９６５５に記載）、及びＵＳ２００３／００３６６４４及びＵＳ２００３／０００９０１５に記載される超抗原を含むが、これらに限定されない。

【０１４１】

制御性Ｔ細胞インデューサー分子は、制御性Ｔ細胞の分化及び／または維持管理を誘導する分子である。かかる分子は、ＴＧＦβ、ＩＬ－１０、インターフェロン－α、及びＩＬ－１５を含むが、これらに限定されない。例えば、ＵＳ２００３／００４９６９６、ＵＳ２００２／００９０７２４、ＵＳ２００２／００９０３５７、ＵＳ２００２／００３４５００、及びＵＳ２００３／００６４０６７を参照されたい。

【０１４２】

アポトーシス誘導分子は細胞死を引き起こす。アポトーシス誘導分子は、毒素（例えば、リシンＡ鎖、突然変異シュードモナス外毒素、ジフテリアトキソイド、ストレプトニグリン、ボアマイシン（ｂｏａｍｙｃｉｎ）、サポリン、ゲロニン、及びヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質）、ＴＮＦα、及びＦａｓリガンドを含む。

【０１４３】

抗原

様々な抗原が抗原提示複合体に結合し得る。抗原の性質は、使用される抗原提示複合体の種類に依存する。例えば、ペプチド抗原はＭＨＣクラスＩ及びクラスＩＩペプチド結合間隙に結合し得る。非古典的なＭＨＣ様分子を使用して、非ペプチド抗原、例えば、リン脂質、複合炭水化物など（例えば、ミコール酸及びリポアラビノマンナンなどの細菌性膜構成要素）を提示し得る。本明細書で使用される場合、「抗原」は「抗原ペプチド」も含

む。

【０１４４】

免疫応答を誘導することができる任意のペプチドは抗原提示複合体に結合し得る。抗原ペプチドは、腫瘍関連抗原、自己抗原、同種抗原、及び感染病原体の抗原を含む。

【０１４５】

「腫瘍関連抗原」は、それらが由来する腫瘍によって排他的に発現する固有の腫瘍抗原、正常な成人組織においてではなく、多くの腫瘍において発現した共有腫瘍抗原（腫瘍胎児抗原）、及び腫瘍が生じた正常な組織によっても発現する組織特異的抗原を含む。腫瘍関連抗原は、例えば、胚抗原、異常な翻訳後修飾を伴う抗原、分化抗原、変異癌遺伝子または腫瘍抑制因子の産物、融合タンパク質、またはオンコウイルス性タンパク質であり得る。

【０１４６】

様々な腫瘍関連抗原は当該技術分野において既知であり、これらの多くは市販されている。腫瘍胎児抗原及び胚抗原は、癌胎児抗原及びα－胎児タンパク質（通常、発育中の胎芽において高く発現するが、肝臓及び結腸それぞれの腫瘍によって頻繁に高く発現する）、ＭＡＧＥ－１及びＭＡＧＥ－３（メラノーマ、乳癌、及びグリオーマにおいて発現する）、胎盤アルカリ性ホスファターゼシアリル－ルイスＸ（腺癌において発現する）、ＣＡ－１２５及びＣＡ－１９（消化管腫瘍、肝腫瘍、及び婦人科腫瘍において発現する）、ＴＡＧ－７２（直腸結腸腫瘍において発現する）、上皮糖タンパク質２（多くの癌腫において発現する）、膵臓癌胎児抗原、５Ｔ４（胃癌において発現する）、α胎児タンパク質受容体（複数の腫瘍の種類、特に乳腺腫瘍において発現する）、ならびにＭ２Ａ（生殖細胞腫瘍症において発現する）を含む。

【０１４７】

腫瘍関連分化抗原は、チロシナーゼ（メラノーマにおいて発現する）及び特定表面免疫グロブリン（リンパ腺において発現する）を含む。

【０１４８】

変異癌遺伝子または腫瘍抑制因子遺伝子産物は、両方が多くの腫瘍の種類において発現するＲａｓ及びｐ５３、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ（乳癌及び産婦人科癌において発現する）、ＥＧＦ－Ｒ、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、網膜芽細胞腫遺伝子産物、ｍｙｃ（肺癌に関連する）、ｒａｓ、ｐ５３、乳房腫瘍に関連する非変異、ＭＡＧＥ－１、及びＭＡＧＥ－３（メラノーマ、肺癌、及び他の癌に関連する）を含む

【０１４９】

融合タンパク質は、慢性骨髄性白血病において発現するＢＣＲ－ＡＢＬを含む。

【０１５０】

オンコウイルス性タンパク質は、子宮頸癌において見出されるＨＰＶ型１６、Ｅ６、及びＥ７を含む。

【０１５１】

組織特異的抗原は、メラノトランスフェリン及びＭＵＣ１（膵臓癌及び乳癌において発現する）、ＣＤ１０（一般的な急性リンパ芽球性白血病抗原、またはＣＡＬＬＡとして以前から既知）または表面免疫グロブリン（Ｂ細胞白血病及びリンパ腫において発現する）、ＩＬ－２受容体のα鎖、Ｔ細胞受容体、ＣＤ４５Ｒ、$CD4^{+}$／$CD8^{+}$（Ｔ細胞白血病及びリンパ腫において発現する）、前立腺特異的抗原及び前立腺酸性ホスファターゼ（前立腺癌において発現する）、ＧＰ１００、ＭｅｌａｎＡ／Ｍａｒｔ－１、チロシナーゼ、ｇｐ７５／ブラウン、ＢＡＧＥ、及びＳ－１００（メラノーマにおいて発現する）、サイトケラチン（様々な癌腫において発現する）、ならびにＣＤ１９、ＣＤ２０、及びＣＤ３７（リンパ腫において発現する）を含む。

【０１５２】

腫瘍関連抗原はまた、変性糖脂質及び糖タンパク質抗原、例えば、ノイラミン酸含有スフィンゴ糖脂質（例えば、メラノーマ及び一部の脳腫瘍において発現する$GM_2$及び$GD_2$）、血液型抗原、特に、癌腫において異常に発現し得るＴ及びシアル酸付加Ｔｎ抗原、

ならびにムチン、例えば、ＣＡ－１２５及びＣＡ－１９－９（卵巣癌腫上に発現する）または糖付加不十分のＭＵＣ－１（乳癌及び膵臓癌上に発現する）も含む。

【０１５３】

組織特異的抗原は、上皮膜抗原（複数の上皮癌において発現する）、ＣＹＦＲＡ２１－１（肺癌において発現する）、Ｅｐ－ＣＡＭ（膵癌において発現する）、ＣＡ１２５（卵巣癌において発現する）、無傷モノクローナル免疫グロブリンまたは軽鎖フラグメント（骨髄腫において発現する）、及びのβサブユニットを含む。

【０１５４】

「自己抗原（ａｕｔｏａｎｔｉｇｅｎ）」は、生物が免疫応答を作り出す生物自体の「自己抗原（ｓｅｌｆ　ａｎｔｉｇｅｎ）」である。自己抗原は、自己免疫疾患、例えば、グッドパスチャー症候群、多発性硬化症、グレーブス病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病、リウマチ性関節炎、尋常性天疱瘡、アジソン病、疱疹状皮膚炎、セリアック病、及び橋本甲状腺炎に関与している。

【０１５５】

糖尿病関連自己抗原は、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）及び他の島細胞自己抗原、例えば、ＩＣＡ５１２／ＩＡ－２タンパク質チロシンホスファターゼ、ＩＣＡ１２、ＩＣＡ６９、プレプロインスリン、またはそれらの免疫学的に活性なフラグメント（例えば、インスリンＢ－鎖、Ａ鎖、Ｃペプチド、またはそれらの免疫学的に活性なフラグメント）、ＨＳＰ６０、カルボキシペプチダーゼＨ、ペリフェリン、ガングリオシド（例えば、ＧＭ１－２、ＧＭ３）、またはそれらの免疫学的に活性なフラグメントを含む。

【０１５６】

黄斑変性関連自己抗原は、補体経路分子ならびにＲＰＥ、脈絡膜、及び網膜からの様々な自己抗原、ビトロネクチン、βクリスタリン、カルレティキュリン、セロトランスフェリン（ｓｅｒｏｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ）、ケラチン、ピルビン酸カルボキシラーゼ、Ｃ１、ならびにビリン２を含む。

【０１５７】

他の自己抗原は、ヌクレオソーム（ヒストン及びＤＮＡを含有する粒子）、リボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）粒子（ＲＮＡ及びＲＮＰ粒子中の特殊機能を媒介するタンパク質を含有する）、及び二本鎖ＤＮＡを含む。さらなる他の自己抗原は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（ＭＯＧ）、ミエリン関連糖タンパク質（ＭＡＧ）、ミエリン／オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質（ＭＯＢＰ）、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質（Ｏｓｐ）、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、プロテオリピドアポタンパク質（ＰＬＰ）、ガラクトースセレブロシド（ＧａｌＣ）、糖脂質、スフィンゴ脂質、リン脂質、ガングリオシド、及び他の神経抗原を含む。

【０１５８】

「同種抗原」は、同種の別のメンバーによって抗原として検出される対立遺伝子の直接または間接産物である。かかる対立遺伝子の直接産物は、コードされたポリペプチドを含み、間接産物は、対立遺伝子コードされた酵素によって合成される多糖及び脂質を含む。同種抗原は、クラスＩ及びクラスＩＩ抗原、ＡＢＯ、ルイス型などの血液型抗原、Ｔ及びＢ細胞上の抗原、ならびに単球／内皮細胞抗原を含む主要及び副組織適合性抗原（ヒトにおいてＨＬＡとして既知）を含む。ＨＬＡ特異性は、Ａ（例えば、Ａ１～Ａ７４、特にＡ１、Ａ２、Ａ３、Ａ１１、Ａ２３、Ａ２４、Ａ２８、Ａ３０、Ａ３３）、Ｂ（例えば、Ｂ１～Ｂ７７、特にＢ７、Ｂ８、Ｂ３５、Ｂ４４、Ｂ５３、Ｂ６０、Ｂ６２）、Ｃ（例えば、Ｃ１～Ｃ１１）、Ｄ（例えば、Ｄ１～Ｄ２６）、ＤＲ（例えば、ＤＲ１、ＤＲ２、ＤＲ３、ＤＲ４、ＤＲ７、ＤＲ８、及びＤＲ１１）、ＤＱ（例えば、ＤＱ１～ＤＱ９）、及びＤＰ（例えば、ＤＰ１～ＤＰ６）を含む。

【０１５９】

「感染病原体の抗原」は、原生動物、細菌、真菌（単細胞及び多細胞の両方）、ウイルス、プリオン、細胞内寄生体、蠕虫、及び免疫応答を誘導し得る他の感染病原体の構成要

素を含む。

【０１６０】

細菌抗原は、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性細菌、嫌気性菌、例えば、放線菌科、バチルス科、バルトネラ科、ボルデテラ科、カプトファーガ科（Ｃａｐｔｏｐｈａｇａｃｅａｅ）、コリネバクテリウム科、エンテロバクテリア科、レジオネラ科、ミクロコッカス科、マイコバクテリウム科、ノカルジア科、パスツレラ科、シュードモナス科、スピロヘータ科、ビブリオ科の生物、ならびにアシネトバクター属、ブルセラ属、カンピロバクター属、エリジペロトリックス属、ユーインゲラ属、フランシセラ属、ガルドネラ属、ヘリコバクター属、レビネア属、リステリア属、ストレプトバシラス属、及びトロフェリーマ属の生物の抗原を含む。

【０１６１】

原生動物の感染病原体の抗原は、マラリア原虫、リーシュマニア種、トリパノソーマ種及び住血吸虫種の抗原を含む。

【０１６２】

真菌抗原は、アスペルギルス、ブラストミセス、カンジダ、コクシジオイデス、クリプトコッカス、ヒストプラスマ、パラコクシジオイデス、スポロスリックス、ムコール目の生物、クロマイコシス及び菌腫を含む生物、ならびに白癬菌属、小胞子菌属、表皮菌属、及びマラセジア属の生物の抗原を含む。

【０１６３】

プリオンの抗原は、スクレイピー、ウシ海綿状脳症（ＢＳＥ）、ネコ海綿状脳症、クールー病、クロイツフェルトーヤコブ病（ＣＪＤ）、ゲルストマンーシュトロイスラーーシャインカー病（ＧＳＳ）、及び致命的家族性不眠症（ＦＦＩ）を引き起こす、プリオンのシアロ糖タンパク質ＰｒＰ２７～３０を含む。

【０１６４】

抗原ペプチドが得られ得る細胞内寄生体は、クラミジア科、マイコプラズマ科、アコレプラスマ科、リケッチア科、ならびにコクシエラ科及びエーリッヒア属の生物を含むが、これらに限定されない。

【０１６５】

抗原ペプチドは、線虫、吸虫、または条虫などの蠕虫から得られ得る。

【０１６６】

ウイルスのペプチド抗原は、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、呼吸シンシチアウイルス、ポックスウイルス、ＨＩＶ、インフルエンザウイルス、及びＣＭＶのものを含むが、これらに限定されない。特に有用なウイルスのペプチド抗原は、ＨＩＶ ｇａｇタンパク質（膜アンカー（ＭＡ）タンパク質、コアキャプシド（ＣＡ）タンパク質、及びヌクレオキャプシド（ＮＣ）タンパク質を含むが、これらに限定されない）、ＨＩＶポリメラーゼなどのＨＩＶタンパク質、インフルエンザウイルスマトリックス（Ｍ）タンパク質及びインフルエンザウイルスヌクレオキャプシド（ＮＰ）タンパク質、Ｂ型肝炎表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、Ｂ型肝炎コアタンパク質（ＨＢｃＡｇ）、Ｂ型肝炎ｅタンパク質（ＨＢｅＡｇ）、Ｂ型肝炎ＤＮＡポリメラーゼ、及びＣ型肝炎抗原などを含む。

【０１６７】

抗原の抗原提示複合体への結合

抗原ペプチドを含む抗原は、米国特許第６，２６８，４１１号に記載される通り、能動的または受動的のいずれかで、抗原提示複合体の抗原結合間隙に結合し得る。任意選択で、抗原ペプチドはペプチド結合間隙に共有結合し得る。

【０１６８】

所望される場合、ペプチドテザー（ｔｅｔｈｅｒ）を使用して、抗原ペプチドをペプチド結合間隙に連結し得る。例えば、複数のクラスＩ ＭＨＣ分子の結晶分析は、β２Ｍのアミノ末端が、ＭＨＣペプチド結合間隙中に存在する抗原ペプチドのカルボキシル末端と非常に近接し、おおよそ２０．５オングストローム離れていることを示す。したがって、

おおよそ１３個のアミノ酸長である比較的短いリンカー配列を使用して、ペプチドを、β２Ｍのアミノ末端に繋ぎ止めることができる。この配列が適している場合には、そのペプチドは、ＭＨＣ結合溝に結合するであろう（米国特許第６，２６８，４１１号参照）。

【０１６９】

Ｂ細胞に影響する分子

「Ｂ細胞に影響する分子」は、Ｂ細胞またはＢ細胞前駆体に対し、増殖または抗体形成の誘導などを含む生物学的影響を有する分子である。かかる分子は、ＣＤ４０リガンド、ならびに上述のサイトカイン及びサイトカイン分子複合体を含む。使用されるサイトカイン分子の種類に応じて、Ｂ細胞は、特定の種類の抗体を産生するようにしむけられる。例えば、ＩＬ－４はＩｇＥの産生を誘導するのが、一方では、ＩＬ－５はＩｇＡの産生を誘導する。

【０１７０】

抗体誘導ナノａＡＰＣ上で使用するための分子複合体

抗体誘導ナノａＡＰＣ上で使用するための分子複合体は、Ｂ細胞表面免疫グロブリンとかみ合うか、またはＢ細胞の表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う複合体である。Ｂ細胞表面免疫グロブリンとかみ合う分子複合体は、ナノａＡＰＣ表面に複合された抗原を含む。Ｂ細胞の表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う分子複合体は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）及びＴＣＲ分子複合体を含む。抗体誘導ナノａＡＰＣはかかる分子複合体の一方または両方の型を含み得る（すなわち、Ｂ細胞表面免疫グロブリンかみ合いまたはＭＨＣ－抗原かみ合い）

【０１７１】

任意の特定の抗原に特異的なＴＣＲは、当該技術分野において周知の方法を使用してクローンできる。例えば、ＵＳ２００２／００６４５２１を参照されたい。クローンされた抗原特異的ＴＣＲはそのように使用され得るか、または以下に記載のＴＣＲ分子複合体を形成するのに使用され得る。

【０１７２】

「ＴＣＲ分子複合体」は、米国特許第６，４５８，３５４号、米国特許第６，０１５，８８４号、米国特許第６，１４０，１１３号、及び米国特許第６，４４８，０７１に記載される。ＴＣＲ分子複合体は少なくとも４つの融合タンパク質を含む。２つの第１の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲα鎖の細胞外ドメインと、を含む。２つの第２の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリンκまたはλ軽鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲβ鎖の細胞外ドメインを、を含む。代替的には、２つの第１の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリン重鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲγ鎖の細胞外ドメインと、を含み、２つの第２の融合タンパク質は、（ｉ）免疫グロブリンκまたはλ軽鎖と、（ｉｉ）ＴＣＲδ鎖の細胞外ドメインと、を含む。２つの第１の融合タンパク質及び２つの第２の融合タンパク質は会合して、ＴＣＲ分子複合体を形成する。各第１の融合タンパク質のＴＣＲ鎖の細胞外ドメイン及び各第２の融合タンパク質のＴＣＲ鎖の細胞外ドメインは、抗原認識間隙を形成する。

【０１７３】

免疫グロブリン重鎖は、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ３、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２β、ＩｇＧ２α、ＩｇＥ、またはＩｇＡの重鎖であり得る。好ましくは、ＩｇＧ１重鎖を使用して、２つの抗原認識間隙を含む二価ＴＣＲ分子複合体を形成する。任意選択で、重鎖の可変領域が含まれ得る。ＩｇＭまたはＩｇＡ重鎖を使用して、五価または四価ＴＣＲ分子複合体それぞれを提供し得る。他の価数を有するＴＣＲ分子複合体もまた、複数の免疫グロブリン鎖を使用して、構築され得る。

【０１７４】

ＴＣＲ分子複合体の融合タンパク質は、免疫グロブリン鎖とＴＣＲポリペプチドの細胞外ドメインとの間に挿入されるペプチドリンカーを含み得る。リンカー配列の長さは、抗原結合及び架橋の度合を調節するために必要な柔軟性によって変化し得る。構築物はまた、ＴＣＲポリペプチドの細胞外ドメインが、追加のリンカー領域無しに、免疫グロブリン

分子に直接及び共有結合的に付着するように設計され得る。リンカー領域が含まれる場合、この領域は、好ましくは、少なくとも３個及び３０個以下のアミノ酸を含有する。より好ましくは、リンカーは約５個及び２０個以下のアミノ酸であり、最も好ましくは、リンカーは１０個未満のアミノ酸である。一般的には、リンカーは短いグリシン／セリンスペーサーからなり、任意のアミノ酸が使用され得る。免疫グロブリン重鎖をＴＣＲαまたはγ鎖の細胞外ドメインに接続するために好ましいリンカーは、ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＴＨＲ－ＳＥＲ－ＧＬＹ（配列番号１）である。免疫グロブリン軽鎖をＴＣＲβまたはδ鎖の細胞外ドメインに接続するために好ましいリンカーは、ＧＬＹ－ＳＥＲ－ＬＥＵ－ＧＬＹ－ＧＬＹ－ＳＥＲ（配列番号２）である。

【０１７５】

特異的細胞集団を誘導及び増殖するためにナノａＡＰＣを使用する方法

抗原特異的Ｔ細胞の誘導及び増殖

本開示は、ＣＴＬ、ヘルパーＴ細胞、及び制御性Ｔ細胞を含む抗原－特異的Ｔ細胞の形成及び増殖を誘導する方法を提供する。これらの方法は、複数の前駆Ｔ細胞を含む単離された調製物を、抗原が抗原結合間隙に結合するナノａＡＰＣと接触させることを伴う。調製物のナノａＡＰＣを伴うインキュベーションは、集団における前駆体細胞を、抗原を認識する抗原特異的Ｔ細胞を形成するように誘導する。抗原特異的Ｔ細胞は、以下に記載の通り、ナノａＡＰＣとともに前駆Ｔ細胞をインキュベートすることによって得ることができるか、または従来の方法、例えば、樹状細胞を伴うインキュベーションによって、または当該技術分野において既知の他の種類の人工抗原提示細胞とともにインキュベートすることによって得ることができる。

【０１７６】

典型的には、第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数または割合のいずれかが、前駆Ｔ細胞が、ＣＤ３に特異的に結合する抗体を含むが、抗原提示複合体を含まない粒子とともにインキュベートされる場合に形成される抗原特異的Ｔ細胞の数または割合を超える。

【０１７７】

ナノａＡＰＣが使用される本明細書に記載の実施形態のうちのいずれかにおいて、抗原提示複合体、結合抗原、及びＴ細胞に影響する分子の任意の組み合わせが使用され得る。例えば、ナノａＡＰＣは、１つ以上のＴ細胞共刺激分子（同一または異なるもののいずれか）、１つ以上の制御性Ｔ細胞誘導分子（同一または異なるもののいずれか）、１つ以上の接着分子（同一または異なるもののいずれか）、及び／または１つ以上のＴ細胞成長因子（同一または異なるもののいずれか）を含み得る。同様に、ナノａＡＰＣは、抗原の任意の組み合わせが結合し得る１つ以上の抗原提示複合体、同一または異なるもののいずれかを含み得る。一実施形態において、例えば、いくつかの異なるメラノーマ関連抗原（例えば、チロシナーゼ、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ＧＰ－１００、Ｍｅｌａｎ　Ａ／ＭＡＲＴ－１、ｇｐ７５／ブラウン、ＢＡＧＥ、及びＳ－１００のうちのいずれかまたは全て）は、１つ以上のナノａＡＰＣ上の抗原提示複合体に結合し得る。

【０１７８】

前駆Ｔ細胞は、患者または好適なドナーから得ることができる。ドナーは一卵性双生児である必要はなく、または患者と親族でさえある必要はない。しかしながら、ドナー及び患者が少なくとも１つのＨＬＡ分子を共有することが好ましい。前駆Ｔ細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、及び腫瘍を含むいくつかの供給源から得ることができる。代替的には、当該技術分野において入手可能なＴ細胞株を使用し得る。

【０１７９】

一実施形態において、前駆Ｔ細胞は、Ｆｉｃｏｌｌ分離などの当業者に既知のいくつもの技法を使用して、対象から収集した一単位の血液から得られる。例えば、個人の循環血液からの前駆Ｔ細胞は、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシスによって得ることができる。アフェレーシス産物は、典型的には、Ｔ細胞及び前駆Ｔ細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含む。アフェレーシスによ

り収集された細胞は、血漿画分を除去するため、かつその後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地中に配置するために、洗浄され得る。洗浄ステップは、例えば半－自動化された「フロー－スルー」遠心分離（例えば、Ｃｏｂｅ２９９１細胞プロセッサー）を製造業者の指示に従い使用することにより、当業者に既知の方法で達成することができる。洗浄後、細胞は、例えば、Ｃａ非含有、Ｍｇ非含有ＰＢＳなどの様々な生体適合性緩衝液中で再懸濁され得る。代替的には、アフェレーシス試料の望ましくない構成要素を除去することができ、細胞を直接培養培地中に再懸濁することができる。所望される場合、前駆Ｔ細胞は、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ（商標）勾配による遠心分離によって、赤血球の溶解及び単球の枯渇により、末梢血リンパ球から単離され得る。

【０１８０】

任意選択で、抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞集団は、第１の細胞集団における抗原特異的Ｔ細胞の数に対して増加した数の抗原特異的Ｔ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な期間、同一のナノａＡＰＣまたは第２のナノａＡＰＣのいずれかとともにインキュベートされ続けられ得る。典型的には、かかるインキュベーションは３～２１日間、好ましくは７～１０日間実行される。

【０１８１】

好適なインキュベーション条件（培養培地、温度など）は、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆体を培養するのに使用されるもの、ならびにＤＣまたは人工抗原提示細胞を使用して抗原特異的Ｔ細胞の形成を誘導するための当該技術分野において既知のものを含む。例えば、Ｌａｔｏｕｃｈｅ　＆　Ｓａｄｅｌａｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８，４０５－０９，Ａｐｒｉｌ　２０００；Ｌｅｖｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５９，５９２１－３０，１９９７；Ｍａｕｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０，１４３－４８，Ｆｅｂｒｕａｒｙ　２００２を参照されたい。以下の特定の例も参照されたい。

【０１８２】

増殖シグナルの大きさを評価するために、抗原特異的Ｔ細胞集団は、ＣＦＳＥで標識され、細胞分裂の速度及び数が分析され得る。Ｔ細胞は、抗原が結合するナノａＡＰＣでの１～２ラウンドの刺激後、ＣＦＳＥで標識され得る。その時点で、抗原特異的Ｔ細胞は、総細胞集団の２～１０％を表すはずである。抗原特異的Ｔ細胞は、抗原特異的Ｔ細胞の分裂の速度及び数が、ＣＦＳＥの喪失に従うことができるように、抗原特異的染色を使用して検出され得る。刺激後異なる時間で（例えば、１２、２４、３６、４８、及び７２時間）、細胞は、抗原提示複合体染色及びＣＦＳＥの両方について分析され得る。抗原が結合していないナノａＡＰＣでの刺激を使用して、増殖のベースラインレベルを判定し得る。任意選択で、増殖は、当該技術分野において既知の$^{3}$Ｈ－チミジンの取込みを監視することにより検出することができる。

【０１８３】

培養物は、ナノａＡＰＣで、異なる時間（例えば、０．５、２、６、１２、３６時間、ならびに連続刺激）刺激することができる。高度に濃縮された抗原特異的Ｔ細胞培養物における刺激時間の影響が評価され得、条件は、ナノａＡＰＣの大きい割合下（例えば、５０、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または９８％）で特定され得、少しの細胞損失で回復され得る。次いで、抗原特異的Ｔ細胞は、培養物中に戻され、細胞増殖、増殖速度、アポトーシスに対する影響、様々なエフェクター機能などについて、当技術分野において既知のように分析される。かかる条件は所望される抗原特異的Ｔ細胞応答によって変化し得る。

【０１８４】

抗原特異的Ｔ細胞の検出

Ｔ細胞前駆体の増殖、活性化、及び分化に対するナノａＡＰＣの影響は、当業者に既知のいくつもの方法でアッセイされ得る。機能の迅速な判定は、各種類のＴ細胞に特異的なマーカーを検出することによって、培養物中のＣＴＬ、ヘルパーＴ細胞、または制御性Ｔ細胞の増加を、決定することにより、増殖アッセイを使用して、達成することができる。

かかるマーカーは当該技術分野において既知である。ＣＴＬは、クロム放出アッセイを使用して、サイトカイン産生または細胞溶解活性をアッセイすることによって検出され得る。

【０１８５】

ナノａＡＰＣ誘導／増殖された抗原－特異的Ｔ細胞上のホーミング受容体の分析

適切なエフェクター機能を有する抗原特異的Ｔ細胞を生成することに加えて、抗原特異的Ｔ細胞効力のための別のパラメータは、Ｔ細胞の病巣への通行を可能にするホーミング受容体の発現である（Ｓａｌｌｕｓｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４０１，７０８－１２，１９９９；Ｌａｎｚａｖｅｃｃｈｉａ ＆ Ｓａｌｌｕｓｔｏ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９０，９２－９７，２０００）。適切なホーミング受容体の不在は、慢性ＣＭＶ及びＥＢＶ感染症の状態に関与していた（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ９８，１５６－６４，２００１）。加えて、抗原特異的Ｔ細胞を増殖するためのプロフェッショナルＡＰＣと非プロフェッショナルＡＰＣの使用の間の留意された１つの差異は、適切なホーミング受容体の発現であり、これはインビボにおける機能不全ＣＴＬの存在の主要因であり得る（Ｓａｌｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７，１１８８－９７，２００１）。

【０１８６】

例えば、エフェクターＣＴＬ効力は、ホーミング受容体、ＣＤ６２Ｌ＋、ＣＤ４５ＲＯ＋、及びＣＣＲ７－の以下の表現型に関連した。したがって、ナノａＡＰＣ誘導及び／または増殖されたＣＴＬ集団は、これらのホーミング受容体の発現について特性評価され得る。ホーミング受容体発現は初期の刺激条件に関連した複合体形質である。おそらく、これは、共刺激複合体ならびにサイトカイン環境の両方によって制御される。関係してきた１つの重要なサイトカインはＩＬ－１２（Ｓａｌｉｏ ｅｔ ａｌ．，２００１）である。以下に考察される通り、ナノａＡＰＣは、生物学的結果のパラメータを最適化するために、個々に分裂した成分（例えば、Ｔ細胞エフェクター分子及び抗原提示複合体）を変化させる可能性をもたらす。任意選択で、ＩＬ－１２などのサイトカインは、抗原特異的Ｔ細胞集団におけるホーミング受容体特性に影響を及ぼすために、初期の誘導培養物中に含むことができる。

【０１８７】

誘導及び／または増殖された抗原特異的Ｔ細胞集団におけるオフレートの分析

二次免疫応答の進行は、ＴＣＲ「オフレート」の分析によって判定される、親和性の焦点化に関係している（Ｓａｖａｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０，４８５－９２，１９９９；Ｂｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８，６１－７０，１９９８；Ｂｕｓｃｈ ＆ Ｐａｍｅｒ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９，７０１－０９，１９９９）。ＴＣＲオフレートの減少（すなわち、増加したＴＣＲ親和性をもたらす）は、少ない量の抗原及び対象のＴ細胞集団の生物学的効力を認識する増加した能力と良く相関するパラメータである。オフレートは、ナノａＡＰＣ媒介した刺激の大きさ及び／または持続期間を変化させることによって最適化され得る。

【０１８８】

他の細胞からの抗原特異的Ｔ細胞の分離

抗原に結合する抗原特異的Ｔ細胞は結合しない細胞から分離され得る。当該技術分野において既知の任意の方法を使用して、磁気濃縮、血漿交換、フローサイトメトリー、または分画遠心法を含むこの分離を達成し得る。一実施形態において、Ｔ細胞は、所望のＴ細胞の正の選択に十分な期間、ビーズ、例えば、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（登録商標）Ｍ－４５０　ＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔなどの抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８共役ビーズとともにインキュベートすることによって単離される。

【０１８９】

所望される場合、抗原特異的Ｔ細胞の亜集団は存在し得る他の細胞から分離され得る。例えば、ＣＤ２８$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$、ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、及びＣＤ４５ＲＯ$^{+}$Ｔ細胞などのＴ細胞の特異的亜集団は、正または負の選択技法によってさらに単離され得る。１

つの方法は、負に選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用する負の磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる、細胞選別及び／または選択である。例えば、負の選択によりＣＤ４$^{+}$細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６、ＨＬＡ－ＤＲ、及びＣＤ８に対する抗体を含む。

【０１９０】

抗原特異的制御性Ｔ細胞は、マーカーＦｏｘｐ３を使用して、他の細胞から検出及び／または分離され得る。その時間は、３０分～３６時間、もしくは１０～２４時間の範囲であり得、または少なくとも１、２、３、４、５、もしくは６時間、または少なくとも２４時間であり得る。より長いインキュベーション時間を使用して、他の細胞の種類と比較してほとんどＴ細胞が存在しない任意の状況で、腫瘍組織または免疫無防備状態の個人から、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を単離するように、Ｔ細胞を単離し得る。

【０１９１】

抗体産生Ｂ細胞の誘導及び増殖

本開示は抗体産生Ｂ細胞の形成を誘導する方法も提供する。これらの方法は、複数の前駆Ｂ細胞を含む単離された調製物を抗体誘導ナノａＡＰＣと接触させることを伴う。抗体誘導ナノａＡＰＣを伴う調製物のインキュベーションは、集団における前駆体細胞に、抗原を特に認識する抗体を産生する抗体産生Ｂ細胞を形成するように誘導する。典型的には、第１の細胞集団における抗体産生Ｂ細胞の数または割合のいずれかは、前駆Ｂ細胞が、非特異的刺激、例えば、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）、リポ多糖（ＬＰＳ）、ヤマゴボウとともにインキュベートされる場合に形成される抗体産生細胞の数または割合を超える。抗体誘導ナノａＡＰＣが使用される本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて、Ｂ細胞に影響する分子及びＢ細胞表面免疫グロブリンまたはＢ細胞表面上のＭＨＣ－抗原複合体とかみ合う複合体の任意の組み合わせが使用され得る。

【０１９２】

前駆Ｂ細胞は患者または好適なドナーから得ることができる。ドナー及び患者は親族である必要はないが、少なくとも１つのＨＬＡ分子を共有することが好ましい。代替的には、当該技術分野において入手可能なＢ細胞株が使用され得る。一実施形態において、前駆Ｂ細胞は、Ｆｉｃｏｌｌ分離などの当業者に既知のいくつもの技法を使用して、対象から収集した一単位の血液から得られる。例えば、個人の循環血液からの前駆Ｂ細胞は、上で考察した通り、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシスによって得ることができる。

【０１９３】

Ｂ細胞またはその前駆体は当該技術分野において既知の方法を使用して培養され得る。例えば、Ｓｃｈｕｌｔｚｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１００，２７５７－６５，１９９７；ｖｏｎ Ｂｅｒｇｗｅｌｔ－Ｂａｉｌｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ９９，３３１９－２５，２００２を参照されたい。かかる条件は、Ｂ細胞前駆体を抗体誘導ナノａＡＰＣとともにインキュベートするのにも好適である。

【０１９４】

任意選択で、抗体産生Ｂ細胞を含む細胞集団は、第１の細胞集団における抗体産生Ｂ細胞の数に対して増加した数の抗体産生Ｂ細胞を含む第２の細胞集団を形成するのに十分な期間、同一の抗体誘導ナノａＡＰＣまたは第２の抗体誘導ナノａＡＰＣのいずれかとともにインキュベートされ続けられ得る。典型的には、かかるインキュベーションは３～２１日間、好ましくは７～１０日間実行される。

【０１９５】

抗体誘導ナノａＡＰＣとＢ細胞との間の相互作用の持続期間を最適化する。

上で考察したＴ細胞刺激と同様に、抗体産生Ｂ細胞の集団を誘導または増殖させるのに必要な刺激の持続期間は、特に人工の非生分解性表面がナノａＡＰＣに使用される場合に、通常発生するものとは異なり得る。したがって、ナノａＡＰＣによる刺激は、数日ではない場合、数時間続く可能性があり得る。様々な抗体誘導ナノａＡＰＣと前駆体または抗体産生Ｂ細胞との間の相互作用の持続期間は、抗原特異的Ｔ細胞について上で考察された

ものと同様の方法を使用して、判定され得る。

【０１９６】

抗体産生Ｂ細胞の検出

Ｂ細胞前駆体の増殖、活性化、及び分化に対する抗体産生ナノａＡＰＣの影響は、当業者に既知のいくつもの方法でアッセイされ得る。機能の迅速な判定は、Ｂ細胞特異的マーカーを検出することによって、または特異的抗体産生をアッセイすることによって、増殖アッセイを使用して、達成することができる。

【０１９７】

磁場及びナノａＡＰＣを使用して、特異的Ｔ細胞集団を誘導及び増殖させる方法

本開示は、磁場におけるＣＴＬ、ヘルパーＴ細胞、及び制御性Ｔ細胞を含む抗原特異的Ｔ細胞の形成及び増殖を誘導する方法を提供する。ナノ粒子プラットフォームは、細胞と混注するとき、[37]ミクロ粒子よりも組織梗塞または炎症を誘導する可能性が低いので、インビボ投与及び細胞療法に良く適合し、鉄デキストランナノ粒子は、例えば、ＧＭＰ等級製剤において入手可能である。

【０１９８】

これらの方法のいくつかの変形は、ポリクローナルＴ細胞の単離された集団を複数のナノａＡＰＣと接触させることを伴う。ナノａＡＰＣは常磁性であり、その表面上に（１）少なくとも１つのＴ細胞に影響する分子と、（ｉｉ）少なくとも１つの抗原提示複合体と、を含む。抗原提示複合体は抗原結合間隙を含み、抗原結合間隙は抗原を含む。ポリクローナルＴ細胞の単離された集団は、抗原特異的Ｔ細胞の集団、すなわち、抗原結合間隙に結合する抗原に特異的なＴ細胞を生成するのに十分な時間、十分な強度の磁場において、ナノａＡＰＣと接触させられる。次いで、ナノａＡＰＣに結合する抗原特異的Ｔ細胞の集団は、例えば、磁気濃縮カラム、フローサイトメトリー、または分画遠心法を使用して、単離され、患者に投与され得る。磁気濃縮を使用して、細胞を単離、続いて、注入する方法は、当該技術分野において周知であり、[38,39]これらの方法のうちのいずれかが、開示された方法の実践において使用され得る。

【０１９９】

開示された方法の他の変形は、複数のナノａＡＰＣを患者に投与し、次いで、磁場を患者または患者の所望の標的領域（例えば、腫瘍または限局性感染）に適用することを伴う。インビボの常磁性粒子及び粒子標識された細胞の輸送へ向けるための磁場の使用は、当該技術分野において既知であり[40-42]、これらの方法のうちのいずれかがナノａＡＰＣを所望の標的領域に向かわせるのに使用され得る。

【０２００】

磁場及びナノ粒子を使用して、優先的に特定の生理状態における細胞を刺激する方法

本開示は、磁気ナノ粒子などのナノ粒子を、異なる生理状態における標的細胞（例えば、ナイーブ対以前に活性化されたＴ細胞）に対して使用し、標的細胞集団を刺激する方法を提供する。例えば、図９Ｃに示され、以下の特定の例においてより詳細が考察される通り、３２ｎｇの用量のＭＨＣを提供するナノａＡＰＣは、１週間後に２０及び３０倍の間でナイーブ及び以前に活性化されたＴ細胞の両方を刺激する。しかしながら、８ｎｇまたは３．２ｎｇのＭＨＣでは、活性化Ｔ細胞のみが刺激された。したがって、例えば、３．２～８ｎｇのＭＨＣを含む用量のナノａＡＰＣを使用して、その集団におけるナイーブＴ細胞に影響を及ぼすことなく、Ｔ細胞集団における以前に活性化されたＴ細胞を刺激することができる。

【０２０１】

３．２～８ｎｇのＭＨＣ対３２ｎｇのＭＨＣを含むナノａＡＰＣの分化作用を使用して、ナノａＡＰＣ結合及びＴ細胞の単離をＴ細胞の活性化から分離し得る。例えば、Ｔ細胞の集団は、例えば、ナイーブＴ細胞のために濃縮された集団を残すＣＤ４４に対する抗体を使用して、以前に活性のＴ細胞を実質的に枯渇させ得る。３．２～８ｎｇのＭＨＣを含むナノａＡＰＣをこの集団に結合させることは、ナイーブＴ細胞を活性化させないが、その精製を可能にする。次いで、結合ナノａＡＰＣを含むナイーブＴ細胞は、ナノ粒子を凝

集させるための当該技術分野において既知の様々な技法によって活性化され得る。磁気ナノ粒子の場合、これは、例えば、Ｔ細胞ナノａＡＰＣ複合体を磁場に曝露することによって達成され得る。

【０２０２】

同一の手法を使用して、分離、特性評価し得、かつ例えば、Ｂ細胞及び幹細胞を、限定するものではなく、例として誘導する他の細胞の治療としての利用。異なる生理状態における集団の細胞を差次的に活性化するであろうナノ粒子の表面上の最適なリガンド密度（または代替的には、かかるリガンドを含むナノ粒子の用量）は、以下の実施例９に記載されるものなどの方法を使用して判定され得る。細胞集団次第で、リガンドは、例えば、抗体または抗体の一部、ペプチド、ヌクレオチド、炭水化物、脂質、所与の受容体のための天然リガンドの全てまたは一部（例えば、ＥＧＦ、ＰＤＧＦ）、化学物質（例えば、クロム塩またはＦＫＢＰ結合ドメインなどのイムノフィリン分子受容体と結合する一価合成リガンド）、単一抗インテグリンＦａｂフラグメント、ＲＧＤペプチドなどを含み得る。

【０２０３】

薬学的調製物

ナノａＡＰＣ、ならびにかかるナノａＡＰＣを使用して得られた抗原特異的Ｔ細胞または抗体特異的Ｂ細胞を含む薬学的調製物は、患者への直接注射のために製剤化され得る。かかる薬学的調製物は、患者に組成物を送達するのに好適な薬学的に許容される担体、例えば、生理食塩水、緩衝された生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、またはリン酸緩衝生理食塩グルコース溶液を含有する。

【０２０４】

免疫療法

投与経路

ナノａＡＰＣ、ならびにナノａＡＰＣを使用して得られた抗原特異的Ｔ細胞または抗体特異的Ｂ細胞は、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与を含む任意の適切な経路によって患者に投与され得る。患者はヒト及び獣医の患者両方を含む。

【０２０５】

治療法

ナノａＡＰＣを使用して、当該技術分野において既知の診断方法及び治療法において使用され得る治療上有用な数の抗原特異的Ｔ細胞または抗体産生Ｂ細胞を生成し得る。例えば、ＷＯ０１／９４９４４、ＵＳ２００２／０００４０４１、米国特許第５，５８３，０３１号、ＵＳ２００２／０１１９１２１、ＵＳ２００２／０１２２８１８、米国特許第５，６３５，３６３号、ＵＳ２００２／００９０３５７、米国特許第６，４５８，３５４号、ＵＳ２００２／００３４５００を参照されたい。

【０２０６】

特に、抗原特異的Ｔ細胞または抗体産生Ｂ細胞を使用して、感染症、癌、または自己免疫疾患を有する患者を治療するか、または免疫抑制された患者に予防的保護を提供し得る。

【０２０７】

治療することができる感染症は、細菌、ウイルス、プリオン、真菌、寄生体、蠕虫などによって引き起こされるものを含む。かかる疾患は、エイズ、肝炎、ＣＭＶ感染症、及び移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）を含む。ＣＭＶは、例えば、臓器移植患者に見出される最も一般的なウイルス性病原体であり、骨髄または末梢血幹細胞移植を経験する患者の罹患率及び死亡率の主要な原因である（Ｚａｉａ，Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ　Ａｍ．４，６０３－２３，１９９０）。これは、血清陽性患者における潜伏ウイルスの再活性化または血清陰性の個人における日和見感染を可能にするこれらの患者の免疫無防備状態に起因する。現在の治療は、ガンシクロビルなどの抗ウイルス性化合物の使用に焦点を当てているが、それは欠点があり、最も重大なものが薬物耐性ＣＭＶの発現である。これらの治療に対する有用な代替は、移植手順の開始の前に患者または

適切なドナーから得られたウイルス特異的ＣＴＬの生成を伴う予防的免疫治療レジメンである。

【０２０８】

ＰＴＬＤは、移植患者の重大な画分において起こり、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）感染によって生じる。ＥＢＶ感染は、米国の成人人口のおおよそ９０％において存在すると思われる（Ａｎａｇｎｏｓｔｏｐｏｕｌｏｓ　＆　Ｈｕｍｍｅｌ，Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ　２９，２９７－３１５，１９９６）。活性ウイルス複製及び感染は、免疫系によって検査され続けているが、ＣＭＶの場合のように、移植療法によって免疫無防備状態の個人は、制御Ｔ細胞集団を失い、それがウイルスの再活性化を可能にする。これは、移植プロトコルの重大な妨害を表す。ＥＢＶはまた、様々な血液学的癌及び非血液学的癌における腫瘍促進に関与し得る。ＥＢＶと鼻咽頭癌腫との強い関連も存在する。したがって、ＥＢＶ特異的Ｔ細胞での予防的治療は現在の療法の優れた代替を提示する。

【０２０９】

治療することができる癌は、メラノーマ、癌腫、例えば、結腸、十二指腸、前立腺、乳、卵巣、管、肝臓、膵臓、腎臓、子宮内膜、胃、異形口腔粘膜、ポリープ症、侵襲性口腔癌、非小細胞肺癌、転移性及び扁平上皮細胞尿路癌など、神経学的悪性疾患、例えば、神経芽細胞腫、グリオーマなど、血液学的悪性疾患、例えば、慢性骨髄性白血病、小児急性白血病、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、悪性皮膚Ｔ細胞、菌状息肉腫、非ＭＦ皮膚Ｔ細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、Ｔ細胞豊富皮膚リンパ球様過形成、水疱性類天疱瘡、円板状紅斑狼瘡、扁平苔癬などを含む。例えば、Ｍａｃｋｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　８６，３８５－９２，２０００；Ｊｏｎｕｌｅｉｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　９３，２４３－５１，２００１；Ｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　２４，６６－７８，２００１；Ｍｅｉｄｅｎｂａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７０（４），２１６１－６９，２００３を参照されたい。

【０２１０】

治療することができる自己免疫疾患は、喘息、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、Ｉ型糖尿病、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、重症筋無力症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、尋常性天疱瘡、アジソン病、疱疹状皮膚炎、セリアック病、及び橋本甲状腺炎を含む。

【０２１１】

抗原特異的ヘルパーＴ細胞を使用して、マクロファージを活性化するか、またはＢ細胞を活性化して、例えば、感染症及び癌を治療するのに使用され得る特異的抗体を産生し得る。抗体産生Ｂ細胞それ自体もこの目的のために使用され得る。

【０２１２】

抗原特異的制御性Ｔ細胞を使用して、例えば、移植患者における移植片対宿主病を治療または予防するか、上に列挙したものなどの自己免疫疾患、またはアレルギーを治療または予防するために、免疫抑制性作用を達成し得る。制御性Ｔ細胞の使用は、例えば、ＵＳ２００３／００４９６９６、ＵＳ２００２／００９０７２４、ＵＳ２００２／００９０３５７、ＵＳ２００２／００３４５００、及びＵＳ２００３／００６４０６７に記載される。Ｔ細胞に影響する分子がアポトーシス誘導分子であるナノａＡＰＣを使用して、免疫応答を抑制し得る。

【０２１３】

用量

抗原特異的Ｔ細胞は、体重の約５～１０×１０$^{6}$ＣＴＬ／ｋｇ（約７×１０$^{8}$ＣＴＬ／治療）～最大約３．３×１０$^{9}$ＣＴＬ／ｍ$^{2}$（約６×１０$^{9}$ＣＴＬ／治療）の範囲の用量で患者に投与され得る（Ｗａｌｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　３３３，１０３８－４４，１９９５；Ｙｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　１９２，１６３７－４４，２０００）。他の実施形態において、患者は、静脈内に投与される１用量当たり１０$^{3}$、５×１０$^{3}$、１０$^{4}$、５×１

$10^4$、$10^5$、$5\times10^5$、$10^6$、$5\times10^6$、$10^7$、$5\times10^7$、$10^8$、$5\times10^8$、$10^9$、$5\times10^9$、または$10^{10}$細胞を受け取ることができる。さらに他の実施形態において、患者は、２００μｌボーラスにおいて、例えば、$8\times10^6$または$12\times10^6$細胞の結節内注射を受けることができる。ナノａＡＰＣの用量は、１用量当たり$10^3$、$5\times10^3$、$10^4$、$5\times10^4$、$10^5$、$5\times10^5$、$10^6$、$5\times10^6$、$10^7$、$5\times10^7$、$10^8$、$5\times10^8$、$10^9$、$5\times10^9$、または$10^{10}$ナノａＡＰＣを含む。

【０２１４】

動物モデル

いくつかのマウスモデルは、腫瘍治療のための養子免疫治療プロトコルを評価するために利用可能である。２つのモデルがメラノーマ治療を評価するのに特に好適である。１つのモデルは、ＢＭＬなどの皮下に移植されたヒトメラノーマ株を保有するヒト／ＳＣＩＤマウスを使用する。かかるモデルにおいて、エクスビボで増殖したＭａｒｔ－１特異的ＣＴＬの移植は、腫瘍の開始及び／または成長を遅延させる。第２のモデルは、マウスＡ２－トランスジェニックマウス、及びＡＡＤと称される、ＨＬＡ－Ａ２様分子がトランスフェクトされたマウスＢ１６メラノーマを使用する。Ａ２－トランスジェニックの基礎でもあるこの分子は、マウスα３ドメインに融合したα１－２ドメイン中のヒトＨＬＡ－Ａ２である。これらのトランスジェニックマウスを使用し、マウスＢ１６－ＡＡＤメラノーマは、チロシナーゼ及びｇｐ１００に由来した明確に定義されたＡ２拘束メラノーマエピトープにわたる拒絶反応に対し敏感である。

【０２１５】

キット

ナノａＡＰＣはキットにおいて提供され得る。ナノａＡＰＣに好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックを含む様々な材料から形成され得る。容器は、無菌のアクセスポートを有しても良い（例えば、容器は、皮下注射針により、貫通可能なストッパーを有する静注液用バッグまたはバイアルであり得る）。任意選択で、１つ以上の異なる抗原はナノａＡＰＣに結合し得るか、または別々に供給され得る。

【０２１６】

キットは、リン酸緩衝食塩水、リンガー液、またはブドウ糖溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第２の容器をさらに含み得る。それは、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針、及びシリンジを含む最終使用者に有用な他の材料を含有し得る。キットはまた、別の活性薬剤、例えば、化学療法剤もしくは抗感染剤を有する、または最終使用者によってナノａＡＰＣの抗原提示複合体に結合し得る特定の抗原を含む第２もしくは第３の容器を含み得る。

【０２１７】

キットはまた、抗原特異的Ｔ細胞または抗体産生Ｂ細胞誘導または増殖の範囲及び効力、例えば、特異的マーカータンパク質に対する抗体、ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩ分子複合体、ＴＣＲ分子複合体、抗クローン形質抗体などを評価するための試薬を含有し得る。

【０２１８】

キットはまた、様々な治療プロトコルにおいて、キット内の抗原特異的Ｔ細胞を誘導、抗原特異的Ｔ細胞を増殖、ナノａＡＰＣを使用する方法について書面による指示を含む添付文書を含み得る。添付文書は、未承認の草稿段階の添付文書であるか、または米国食品医薬品局（ＦＤＡ）または他の規制機関により承認された添付文書であり得る。

【０２１９】

当業者は、添付の特許請求の範囲内である上述の実施形態の多数の変形及び交換が存在することを理解するであろう。

【実施例】

【０２２０】

実施例１
実施例２～７の材料及び方法
マウス及び試薬。２Ｃ ＴＣＲ Ｒａｇ－／－トランスジェニックマウスを、Ｃ５７／ＢＬ６環境で飼育することによって、ヘテロ接合体として維持した。ｐＭＥＬ ＴＣＲ／Ｔｈｙ１ａ Ｒａｇ－／－トランスジェニックマウスは、Ｎｉｃｈｏｌａｓ Ｒｅｓｔｉｆｏ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）からの贈り物であり、ホモ接合体として維持された。Ｃ５７ＢＬ／６ｊマウスはＪａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）から購入した。全てのマウスを、Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙの治験審査委員会に従い維持した。蛍光標識されたモノクローナル抗体は、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から購入した。

【０２２１】
ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの調製。可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマー、Ｋｂ－Ｉｇ、及びＤｂ－Ｉｇを調製し、記載の通りペプチドで充填した（４８）。簡潔に、Ｋｂ－Ｉｇ分子を、アルカリ条件（ｐＨ１１．５）で取り除くことによってペプチドで充填し、次いで、５０倍の過剰ペプチドの存在下で再び折り畳んだ。Ｄｂ－Ｉｇ分子を、弱酸性条件下で（ｐＨ６．５）取り除き、５０倍のモル過剰ペプチド及び２倍のモル過剰のヒトβ２－ミクログロブリンの存在下で再び折り畳んだ。ヒトＡ２－Ｉｇを、過剰Ｍ１ペプチドの存在下で受動的に充填した（４９）。ペプチド「ＳＩＹ」（ＳＩＹＲＹＹＧＬ、配列番号３、合成）、「ＳＩＩＮ」（ＳＩＩＮＦＥＫＬ、配列番号４、卵白アルブミンタンパク質に由来）、「ＧＰ１００」（ＫＶＰＲＮ量子ドットＷＬ、配列番号５、メラニン形成細胞ＧＰ１００タンパク質から）、「ＡＳＮ」（ＡＳＮＥＮＭＥＴＨ、配列番号６、インフルエンザＡ核タンパク質から）、及び「Ｍ１」（ＧＩＬＧＦＶＦＴＬ、インフルエンザＡ Ｍ１タンパク質から）は、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）から購入した。タンパク質濃度を、サイズ排除高速液体クロマトグラフィーによって、標識後に判定した。

【０２２２】
粒子製造及び特性評価。ナノスケール鉄デキストランａＡＰＣを２つの方法のうちの１つで製造した。２μＭのビオチン化ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び等モル濃度のビオチン化抗ＣＤ２８抗体を、４℃で穏やかに撹拌しながら少なくとも１時間、１００μＬの抗ビオチンＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）とともにインキュベートした。非結合タンパク質を、ＭＳ磁気濃縮カラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して洗浄した。粒子濃度を、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ ＡＤ３４０プレートリーダーを使用して、４０５ｎｍでの吸収度によって測定した。

【０２２３】
代替的には、ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及びＢ７．１－Ｉｇを生分解性粒子（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）に直接化学的に結合した。合計タンパク質含有量をＢｒａｄｆｏｒｄ Ａｓｓａｙによって評価した。別途記載のない限り、「鉄デキストランａＡＰＣ」は、抗ビオチン結合ではなく、ＭＨＣ及びＢ７．１に直接化学的に結合される粒子を指す。

【０２２４】
５μＭのビオチン化ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び等モル濃度のビオチン化抗ＣＤ２８抗体を、４℃で２時間、１００μＬの１μＭストレプトアビジンコーティングされた量子ドット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）とともにインキュベートすることによって、ナノスケール量子ドットａＡＰＣを製造した。量子ドットを洗浄し、３００，０００分子量をカットオフしたＳａｒｔｏｒｉｕｓ Ｖｉｖａｓｐｉｎ Ｍｅｍｂｒａｎｅを使用して濃縮した。量子ドット濃度を、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ ＡＤ３４０プレートリーダーを使用して、４０５ｎｍでの吸収度によって測定した。

【０２２５】
ナノ粒子トラッキング分析。高感度ＣＣＤカメラを装備するＮａｎｏｓｉｇｈｔ ＬＭ１０を、ＮＴＡによって酸化鉄ａＡＰＣを特性評価するために使用した。５０μＬの希釈ナノ粒子溶液を、４０５ｎｍのレーザー源に接続された試料室中に充填した。散乱重心（

粒子）のＢｒｏｗｎｉａｎ運動トラッキングを含む６０秒の動画を、ＮＴＡソフトウェア（バージョン２．０）を使用して録画した。動画を、推奨される通りのゲイン、ぼかし、及び輝度の手動調節を伴う製造業者が推奨する自動設定を使用して処理した。ナノ粒子溶液を、リン酸緩衝食塩水中で希釈して、試料濃度を$5\times10^{12}$粒子$mL^{-1}$に調節した。

【０２２６】

インビトロの細胞増殖。マウス細胞培養のため、細胞を均質化されたマウス脾臓から獲得し、続いて、低浸透圧性溶解によってＲＢＣを枯渇させた。細胞傷害性リンパ球を、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ（Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ）からのＣＤ８ノータッチ単離キット及び磁気濃縮カラムを使用して単離し、必要な場合は、３７℃で１５分間、カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル（ＣＦＳＥ）で標識し、次いで、広範囲にわたって洗浄した。指示された薬用量での１００万個のＣＤ８＋Ｔ細胞及び粒子を混合し、Ｔ細胞要因、ヒト血漿から採取されたサイトカインカクテルで補充された完全なＲＰＭＩ培地において、４～７日間、９６ウェル丸底プレート中で培養した（５）。ＣＦＳＥ蛍光を、ＢＤ ＦａｃｓＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターを使用して、４日目に測定し、ＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）において分析した。

【０２２７】

ヒト細胞培養では、健康なＨＬＡ＊０２０１陽性ドナーからのＰＢＭＣを、製造業者のプロトコル（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に従い、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ ＰＬＵＳ勾配遠心分離によって単離した。ＣＤ８＋Ｔ細胞を、ＣＤ８＋Ｔ細胞負の選択キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して、新たなＰＢＭＣからさらに精製した。ＣＤ８＋Ｔ細胞の純度は、フローサイトメトリーによって判定したとき、９５％より高かった。指示された薬用量での３００万個のＣＤ８＋Ｔ細胞及び粒子を混合し、Ｔ細胞因子で補充された完全なＲＰＭＩ培地において、最大１４日間、９６ウェル丸底プレート中で培養した。刺激後の７日目に、Ｔ細胞を採取、計数、及び同一のＴ細胞：ナノａＡＰＣ密度で再播種した。抗原特異性を、製造業者のプロトコルに従い、ＨＬＡ－Ｍ１－特異的、Ａ＊０２０１ＰＥまたはＡＰＣテトラマー（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して判定した。

【０２２８】

細胞内サイトカイン染色。一次刺激の７日後、Ｔ細胞機能活性を、ペプチドパルスＣ５７Ｂｌ／６ｊ脾細胞での再チャレンジによって評価した。脾細胞を、３７℃で２時間、指示された濃度のペプチドでパルスし、次いで洗浄した。２００，０００個のＴ細胞を、０．２μｌのＧｏｌｇｉＰｌｕｇ、０．２ｕＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐ、及び抗ＣＤ１０７ａ－ｆｉｔＣ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）の存在下で、丸底９６ウェルプレート中で、２００，０００個の脾細胞を用いて、完全なＲＰＭＩにおいて、４時間インキュベートした。細胞を洗浄し、製造業者の指示に従い、ＢＤ Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍキット（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して固定し、次いで、抗ＩＦＮγＰＥ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で染色した。サイトカイン染色を、フローサイトメトリーによって評価し、サイトカイン機能細胞の発生頻度を、ＦｌｏｗＪｏにおける無刺激の対照との比較によって評価した。

【０２２９】

インビボの皮下腫瘍成長に対するナノａＡＰＣの影響。量子ドットａＡＰＣ実験のため、$2\times10^{6}$ナイーブＣＤ８＋ｐＭＥＬ Ｔ細胞を、尾静脈注射により、Ｔ細胞またはａＡＰＣ処置を受けない対照マウス以外の８週間の年齢のＣ５７ＢＬ／６雄マウスに養子移植した。同日に、Ｂ１６メラノーマ細胞（$2\times10^{5}$）を右脇腹に皮下注射した。翌日、マウスを、１群当たり５匹のマウスで、２０μＬの同族量子ドットａＡＰＣ、２０μＬの非同族量子ドットａＡＰＣ、または２０μＬのＰＢＳいずれかで処置した。マウスを、３０，０００単位の腹腔内ＩＬ－２で、３、４、及び５日目に処置した。腫瘍成長を、腫瘍のサイズが、動物が安楽死させられる約２００$mm^{2}$になるまで、デジタルキャリパーを使用して、２日の間隔で監視した。

【０２３０】
鉄デキストランａＡＰＣ実験のため、２×１０$^{6}$ナイーブＣＤ８＋ｐＭＥＬ　Ｔ細胞を前のように養子移植した。４日後、処置群のマウスは、１群当たり８匹のマウスで、２５μＬの同族ＨＤナノａＡＰＣを静脈内または皮下のいずれかに受けた。３日後、ａＡＰＣを、皮下（ｓｃ）または静脈内（ｉｖ）のいずれかに注射した。Ｂ１６メラノーマ細胞（２×１０$^{5}$）を、４日後に皮下に注射し、ａＡＰＣの第２の注射を、腫瘍の４日後、同側脇腹の静脈内または皮下のいずれかに与えた。腫瘍トラッキング及び動物安楽死を上の通り続行した。
【０２３１】
実施例２
鉄デキストランナノａＡＰＣはＴ細胞増殖を誘導する
Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎによって生成されたナノサイズの酸化鉄コア、デキストランコーティングされた粒子を、広範囲な特性評価及び生体適合性のため、ナノスケール粒子プラットフォームとして選択した（２１～２３）。ナノスケールａＡＰＣを生成するため、適切なペプチドで充填された可溶性ダイマーＭＨＣ－Ｉｇ（シグナル１）及びキメラＢ７．１－Ｉｇ融合タンパク質（シグナル２）を、粒子表面に対して１：１の比率で、共有結合した（図１Ａ）。代替的には、ビオチン化ＭＨＣ－Ｉｇ及び抗ＣＤ２８を、抗ビオチンコーティングされた鉄デキストラン粒子と結合することによって、粒子を製造した（図１Ｂ）。
【０２３２】
鉄デキストランａＡＰＣは、ナノ粒子トラッキング分析を使用して、単分散及び５０～１００ｎＭの直径であることが確認された（ＮＴＡ、図１Ｃ）。粒子を８．３ｎＭ（５×１０$^{12}$粒子ｍＬ$^{-1}$と等価である）の濃度で懸濁し、全てのその後の体積はこの濃度での粒子を指す。結合反応の間に存在するタンパク質の量を滴定することによって、我々は、Ｂｒａｄｆｏｒｄ　Ａｓｓａｙによって測定された高密度（ＨＤ、６５ｕｇのタンパク質／ｍＬ（粒子））または低密度（ＬＤ、１６ｕｇのタンパク質／ｍＬ（粒子））のタンパク質を提示する粒子を合成した。
【０２３３】
ａＡＰＣ誘導されたＴ細胞増殖を評価するために、我々は、２つのＴＣＲトランスジェニックマウスモデル、すなわち、ＭＨＣクラスＩ　Ｈ２－Ｋ$^{b}$との関連で、提示されるＳＩＹペプチドを認識する受容体を保有する２Ｃマウス、及びＭＨＣクラスＩ　Ｈ２－Ｄ$^{b}$，との関連で、提示されるメラノーマ分化抗原ＧＰ１００に由来するペプチドを認識するｐＭＥＬマウスを利用した。上述の同族ペプチドまたは非同族ペプチドのいずれかで充填されたＫ$^{b}$またはＤ$^{b}$のいずれかを提示する、４種類の抗ビオチン結合鉄デキストラン粒子を製造した（Ｋ$^{b}$ではＳＩＩＮ、Ｄ$^{b}$ではＡＳＮ）。Ｔ細胞を、粒子とともにインキュベートし、増殖を７日後に評価した。２Ｃ細胞は、Ｋ$^{b}$－ＳＩＹ粒子の存在下でのみ増殖し、ｐＭＥＬ細胞は、Ｄ$^{b}$－ＧＰ１００粒子の存在下でのみ増殖するので、粒子に基づく増殖は抗原特異的であった（図２Ａ）。さらに、シグナル１及びシグナル２の両方は最適な増殖のために必要であり、ＭＨＣ－ＩｇまたはＣＤ２８単独のいずれかを担持する抗ビオチン粒子は、堅固なＴ細胞増殖を誘導するのに有効ではなかった（図２Ｂ）。
【０２３４】
ＡＰＣによって提示された抗原の量（２４、２５）及び密度（２６、２７）の両方は、増殖及び細胞死などの下流Ｔ細胞挙動に影響を及ぼし、したがって、ａＡＰＣ刺激の重要なパラメータであり得る。ＨＤ及びＬＤ粒子を使用して、Ｔ細胞増殖に対する抗原密度の影響を評価し、両方の組の粒子を滴定して、抗原用量の影響を評価した。増殖を、生体染色色素カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル（ＣＦＳＥ）を使用する刺激の３日後、特に特性評価した。ＣＦＳＥを、各ラウンドのＴ細胞分裂で希釈し、したがって、分裂はＣＦＳＥ蛍光の１．５倍の減少として現れる。刺激の７日後、Ｔ細胞を計数して、増殖と死との間の全体的な均衡を特性評価した。
【０２３５】

ＨＤ及びＬＤ粒子の両方は、用量依存的な様式で、ｐＭＥＬ　Ｔ細胞増殖を誘導することができた（図２Ｃ）。ＣＦＳＥ希釈によって測定された通り、ＨＤ粒子は、１００万個の細胞当たり、１、５、及び２０μＬの粒子、それぞれに対して７９％、９８％、及び９９％の細胞の増殖を誘導したが、一方で、同一の量のＬＤ粒子は、４％、４０％、及び９３％の細胞の増殖を誘導した。７日目までに、ＨＤ及びＬＤ粒子は、増殖を誘導するのに必要なおおよそ５μＬのＬＤ粒子及び０．５μＬ未満のＨＤ粒子の最小閾値を伴い、約５～３０倍のＴ細胞の全体的な増殖を誘導した（図２Ｄ）。ＣＦＳＥ増殖及び細胞計数の両方は、任意の所与の量の粒子で、ＨＤナノａＡＰＣが、ＬＤより多い増殖を誘導したことを示した。例えば、５μＬの粒子で、ＨＤ粒子は２１倍増殖を誘導したが、一方で、ＬＤ粒子は７倍増殖のみを誘導した。

【０２３６】

ＨＤ粒子上の増加した量のタンパク質が増殖利点の完全な主要因であるかどうかを評価するために、ＬＤ及びＨＤ粒子を、等価のタンパク質濃度（つまり、所与の濃度のＨＤで、おおよそ５倍多いＬＤ粒子）で、Ｔ細胞とともにインキュベートした。一旦、ａＡＰＣがタンパク質濃度のために正規化されると、ＨＤ及びＬＤ粒子は、３日目のＣＦＳＥ希釈によって測定された同様の増殖（図２Ｅ）または７日目の全体的な増殖（図２Ｆ）を誘導した。例えば、２０ｕＬのＬＤ粒子または３．５ｕＬのＨＤ粒子両方は、３日目までに９４％の細胞の増殖、及び７日間の成長後のおおよそ１７倍の増殖を誘導した。したがって、評価された抗原用量及び密度で、増殖は、粒子用量またはタンパク質密度ではなく、ａＡＰＣ上に存在する合計タンパク質によって引き起こされた。

【０２３７】

実施例３

ナノａＡＰＣは堅固なＴ細胞エフェクター表現型を誘導する

十分な数の抗原特異的Ｔ細胞を生成することは免疫療法の重要な目標である。しかしながら、ＣＴＬはアネルギー性になり得るどころか、特定の刺激条件下（２８）では抑制性にさえなり得るので、増殖したリンパ球はまた、ＩＦＮγなどの重要なエフェクターサイトカインを産生し、かつ脱顆粒マーカーＣＤ１０７ａの表面発現によって示される細胞傷害性顆粒を分泌するそれらの能力のために評価されなければならない。ナノａＡＰＣ誘導された刺激後のＣＴＬ機能を評価するために、全ＣＤ８＋ＣＴＬを、３つの異なる粒子濃度、すなわち、当量のタンパク質を示し、したがって、等価のおおよそ１０倍増殖を誘導する３．５ｕＬのＨＤ及び２０ｕＬのＬＤ粒子、及びおおよそ１７倍増殖を誘導する２０ｕＬのＨＤ粒子、で刺激した（図３Ａ）。粒子に基づく刺激の７日後、ＣＴＬを採取し、ペプチドパルス脾細胞で再チャレンジし、細胞内サイトカインアッセイによって機能応答を評価した。

【０２３８】

機能応答は堅固で、全ての３つの粒子用量に対して等価であった。全ての群のＣＴＬは高いレベルのＣＤ１０７ａを発現し、高用量のペプチドで再チャレンジしたときに最大９０％の細胞が脱顆粒した（図３Ｂ）。同様に、全ての３つの群は高いレベルのＩＦＮγ応答性を示した（図３Ｃ）。したがって、粒子とＴ細胞との比率及び粒子上のタンパク質密度は、ＣＴＬ増殖の度合に影響を及ぼすが、結果として生じるＴ細胞は、粒子用量にかかわらず、同様の強いエフェクター表現型を示す。

【０２３９】

エフェクター表現型も、ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌ発現を測定することによって評価した。活性化後、Ｔ細胞はＣＤ４４を上方制御する。高ＣＤ６２Ｌ発現を保持する部分集合の細胞は、「セントラルメモリ」Ｔ細胞（Ｔｃｍ）と名付けられ、高い増殖能を有する。ＣＤ６２Ｌを下方制御する残存細胞は、「エフェクターメモリ」（Ｔｅｍ）と名付けられ、組織への通行であり、堅固なエフェクター応答のために刺激されるが、再チャレンジに際して増殖のより低い能力を有する。これらのＴ細胞表現型はインビボのメモリ発達のため実証されたが、インビトロの活性化細胞は同様の表現型を示し、インビボのメモリ形成のためのモデルとして機能し得る。ナノａＡＰＣ刺激Ｔ細胞培養のための代表的な染色パタ

ーンは図３Ｅに示される。ＨＤ及びＬＤ粒子の両方は堅固なＣＤ４４上方制御を誘導した（図３Ｆ）。より低い用量の粒子はより高い割合のＣＤ６２Ｌｌｏ　ＣＤ４４ｈｉ　Ｔｅｍ細胞を生成し、２ｕＬのＬＤ及び２ｕＬのＨＤは５１％及び３６％Ｔｅｍ、それぞれを生成した。Ｔｅｍ細胞の割合は用量依存的様式で減少したが、検査された全ての培養物はナイーブＴｃｍ、及びＴｅｍ細胞を含有した。

【０２４０】

実施例４

内因性ヒトＴ細胞応答のナノａＡＰＣ増殖

抗原特異的前駆体Ｔ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の低い発生頻度の不均質集団として存在する。したがって、免疫療法は、最終的に、内因性前駆体のポリクローナルプールからの抗原反応性ＣＴＬの増殖に依存する。

【０２４１】

インフルエンザタンパク質Ｍ１（シグナル１）及び抗ＣＤ２８（シグナル２）に由来する免疫優性Ｔ細胞エピトープで充填されたヒトＨＬＡ対立遺伝子Ａ２を保有する、抗ビオチン鉄デキストランａＡＰＣを合成した。ＰＢＭＣを、漸増用量のナノａＡＰＣとともにインキュベートし、抗原特異的Ｔ細胞増殖を、２回の連続刺激の後、テトラマー染色によって評価した（図４）。

【０２４２】

刺激前、末梢血中のＭ１特異的前駆体発生頻度は、０．４％特異的ＣＤ８＋ＰＢＭＣで、低かった（図４Ａ、上段列）。１（中間列）または２（下段列）週間のナノａＡＰＣを伴うインキュベーションは、抗原特異的Ｔ細胞の割合の用量依存的増加をもたらした。これらのデータは図４Ｂに要約される。最高用量（３００ｕＬ）のナノａＡＰＣは、１週間後に最大４４％の抗原特異的Ｔ細胞、または２週間後に８０％を誘導した（左パネル）。これは、最高粒子用量で、１週間後に最大１５０倍増殖及び２週間後に８００倍増殖を伴う、抗原特異的Ｔ細胞の総量の用量依存的増加に関連した（右パネル）。したがって、ナノａＡＰＣは、小さな内因性前駆体集団から抗原特異的Ｔ細胞の大きな集団を誘導した。

【０２４３】

実施例５

量子ドットナノａＡＰＣ

さらに小さな尺度でナノａＡＰＣに基づく刺激を評価するために、かつナノａＡＰＣがプラットフォーム排他的でないことを示すために、我々は、市販の量子ドットコア、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからの直径２０ｎｍ未満のアビジンコーティングされたナノ結晶を得た。ビオチン標識されたダイマーＤ$^{b}$－ＧＰ１００（シグナル１）及び抗ＣＤ２８抗体（シグナル２）を、ナノ結晶表面に対して１：１のモル比で結合して、量子ドット（量子ドット）ナノａＡＰＣを形成した（図５Ａ）。

【０２４４】

量子ドットａＡＰＣは、インビトロの用量依存的な抗原特異的Ｔ細胞増殖を誘導した（図５Ｂ）。評価された最高用量で、Ｔ細胞は７日後に１４．６倍増殖したが、一方で、非同族対照量子ドットａＡＰＣで刺激されたＴ細胞は増殖しなかった。

【０２４５】

実施例６

インビボのナノａＡＰＣ一次腫瘍拒絶

メラノーマの皮下マウスモデルは、インビボに直接注射されるとき、免疫療法のためのナノスケールａＡＰＣの効力を示すために選択された。量子ドットａＡＰＣを評価するために、ナイーブＴＣＲトランスジェニックｐＭＥＬ　ＣＴＬを、野生型Ｂ６マウスに養子移植し、マウスは、右脇腹の皮下に注射されたＢ１６メラノーマ細胞と同日に、チャレンジされた（図６Ａ、上段）。翌日、マウスに、２０ｕＬの同族量子ドットａＡＰＣまたは２０ｕＬの非同族量子ドットａＡＰＣまたは対照としてＰＢＳのいずれかを注射した。量子ドットａＡＰＣの単一注射は、腫瘍成長を有意に減弱させた（図６Ａ、下段）。１６日後、Ｔ細胞及び同族量子ドットａＡＰＣで処置されたマウスは、Ｔ細胞＋非同族ａＡＰＣ

処置マウスでは１１１．１ｍｍ$^2$＋／－２９．４、Ｔ細胞単独では１４１．１ｍｍ$^2$＋／－９．６、及び未処置マウスでは１３３．１ｍｍ$^2$＋／－７．６と比較して、２２．１ｍｍ$^2$２．３の平均腫瘍サイズを有する最小腫瘍量を有した。一連の実験にわたる合計腫瘍成長を濃度曲線下面積（ＡＵＣ）として要約した。同族量子ドット－ａＡＰＣで処置されたマウスは、対照、非同族ａＡＰＣ（３７３．６ｍｍ$^2$＋／－２２７．０）で処置されたマウスよりも、ＡＵＣ（３３．１ｍｍ$^2$＋／－７．８）により、有意に低い（ｐ＝０．０２８）全体的な腫瘍成長を有した。

【０２４６】

以前に記載した通り、ナノａＡＰＣの腫瘍またはリンパ節中のＴ細胞プールへの通行の能力は、ナノａＡＰＣ免疫療法の重大な利点であり得る。粒子投与経路は、ビーズ輸送に影響を与える可能性が高く、例えば、皮下に沈着したビーズは、リンパ管を介してリンパ節へと排出され得る（３０）。ａＡＰＣ投与経路の影響、ならびに鉄デキストランａＡＰＣのインビボでの効力を試験するために、粒子を、ｐＭＥＬ養子移植の３日後に静脈内または皮下のいずれかに注射した。Ｂ１６腫瘍を、４日後、右脇腹の皮下に注射し、ａＡＰＣの第２の注射を、腫瘍の４日後に、同側脇腹の静脈内または皮下のいずれかに与えた。したがって、３つの処置群、すなわち、２回の静脈内ビーズ注射を受けたマウス、１回の静脈内注射及び１回の皮下注射を受けたマウス、及び２回の皮下注射を受けたマウスが存在した（図６Ｂ、上段）。非同族ａＡＰＣを注射された対照マウスは１回の静脈内注射及び１回の皮下注射を受けた。

【０２４７】

全ての３つの処置群は、対照ビーズを注射されたマウスよりも低い腫瘍成長を有した（図６Ｂ、下段）。１６日後、１回の皮下注射及び１回の静脈内注射（ｓｃ／ｉｖ）で処置されたマウスは、最小腫瘍成長（４８．０ｍｍ$^2$＋／－３１．１６）を示し、続いて、ｓｃ／ｓｃ処置（７３．７ｍｍ$^2$＋／－３７．４４）、ｉｖ／ｉｖ処置（８９．４ｍｍ$^2$＋／－６９．５）、未処置（８８．４ｍｍ$^2$＋／－１７．８）、及び非同族処置（１１３ｍｍ$^2$＋／－３９．４）であった。一連の実験全体にわたって、ｓｃ／ｉｖ処置されたマウス（ＡＵＣ　５２．６ｍｍ$^2$＋／－２９．７）及びｓｃ／ｓｃマウス（ＡＵＣ　７３．１ｍｍ$^2$＋／－３６．１）は、対照マスス（ＡＵＣ　１６２．７ｍｍ$^2$＋／－７７．６）よりも有意に低い（ｐ＜０．０２）腫瘍成長を示した。２回のＩＶ注射で処置されたマウスは、対照より小さな腫瘍（ＡＵＣ　１０３．０＋／－８６．１）を有したが、重要性閾値（ｐ＝０．１９）には達しなかった。したがって、皮下に送達された少なくとも１回の用量のナノａＡＰＣで処置されたマウスは、対照よりも有意に小さな腫瘍を有した。

【０２４８】

実施例７

ナイーブＴ細胞の刺激

生物物理学的なＭＨＣ－Ｉｇオフレートアッセイを使用して、ナノａＡＰＣは、活性Ｔ細胞と比較して、ナイーブからより容易に解離し、ナノａＡＰＣが、活性化細胞（１６－２０）とよりも、ナイーブ細胞（８－１０）と少ない接触をすることを示唆する。誘導されたＴＣＲクラスタ形成（Ｌｉｌｌｅｍｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１１，９０－９６，２０１０及び膜再構築（Ｊａｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４８７，６４－６９，２０１２）がＴ細胞活性化を引き起こすと思われるので、したがって、ナノａＡＰＣが、ミクロａＡＰＣよりもナイーブＴ細胞を刺激することにおいて有効でないことは驚くべきことではない。１００，０００個のＴ細胞当たり、６ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇの当量用量で、ナノａＡＰＣは、ナイーブ細胞単独ではなく、ナイーブとメモリ細胞の混合集団を刺激するが、一方で、ミクロａＡＰＣは、両方の集団を同等に刺激し得る（図７Ａ）。ナノ粒子の用量が６倍増加する場合、ナノａＡＰＣはナイーブＴ細胞活性化を誘発することができる（データは示されない）。ナノａＡＰＣ及びミクロａＡＰＣの用量が滴定されて、活性化細胞における等価の１７倍増殖を誘導したとき、ナノａＡＰＣではなくミクロａＡＰＣは、その用量でナイーブ細胞の増殖を誘導した（図７Ｂ）。

【０２４９】
しかしながら、最適なＴ細胞免疫療法は、免疫疲労を回避するために、ナイーブＴ細胞の活性化を必要とし得る（Ｂｅｓｓｅｒ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １６，２６４６－５５，２０１０）。したがって、我々は、ナイーブ細胞のナノａＡＰＣ媒介活性化を向上するために２つの手法を使用した。我々は、最初に、抗原特異的前駆体の濃縮が、ａＡＰＣ媒介活性化を上昇させる、Ｔ細胞を活性化するのに利用可能なＩＬ－７及びＩＬ－１５などの免疫刺激サイトカインの量を増加させるであろうと仮定した。常磁性であるナノａＡＰＣは、４℃で野生型Ｔ細胞に結合し、次いで、磁気カラム上の正の選択を使用して濃縮した（図８Ａ）。これは、活性化７日後に、Ｋｂ－ＴＲＰ２特異的Ｔ細胞集団の増殖をもたらした（図８Ｂ）。我々は、これがＴ細胞を同時に濃縮及び活性化し得るａＡＰＣの最初の記載であると思う。

【０２５０】
次に、我々は、ＴＣＲクラスタ形成を向上させ、活性化を誘発するための磁石誘導ビーズクラスタ形成の使用を探索した。ナイーブＴ細胞の増殖を誘発しなかった低用量のナノａＡＰＣでは、磁場におけるＴ細胞活性化は、ＰＭＥＬ Ｔ細胞に有意な増殖利点を与えた（図８Ｃ）。磁石向上した活性化は、磁場における少なくとも３０分のインキュベーションを必要とし（データは示されない）、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃによって販売されるネオジムディスク磁石及び磁気濃縮カラムの両方で有効であった。これは、Ｔ細胞活性化を向上させるための新規の方法を示唆し、ナノａＡＰＣが、ＴＣＲ－ＭＨＣ相互作用を直接通じてＴ細胞を活性化させるためだけではなく、磁石を介してナノａＡＰＣを制御することによって使用され得ることを示唆する。これは、この尺度でのＴＣＲ－粒子相互作用に依存し、より大きなａＡＰＣでは実現可能でない。重要なことに、ナノａＡＰＣは、磁気上昇のためにシグナル１、シグナル２、及び常磁性コアを提供しなければならず、これを養子免疫治療のための以前のナイーブＴ細胞の増殖のための固有及び新規の試薬にさせる。

参考文献

１．Ｚｈａｎｇ，Ｎ．，ａｎｄ Ｍ．Ｊ．Ｂｅｖａｎ．２０１１．ＣＤ８（＋）Ｔｃｅｌｌｓ：ｆｏｏｔ ｓｏｌｄｉｅｒｓ ｏｆ ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｅ ｓｙｓｔｅｍ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．３５：１６１－８．
２．Ａｈｌｅｒｓ，Ｊ．Ｄ．，ａｎｄ Ｉ．Ｍ．Ｂｅｌｙａｋｏｖ．２０１０．Ｍｅｍｏｒｉｅｓ ｔｈａｔ ｌａｓｔ ｆｏｒｅｖｅｒ：ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｏｐｔｉｍｉｚｉｎｇ ｖａｃｃｉｎｅ Ｔ－ｃｅｌｌ ｍｅｍｏｒｙ．Ｂｌｏｏｄ．１１５：１６７８－８９．
３．Ｄｕｄｌｅｙ，Ｍ．Ｅ．，Ｊ．Ｃ．Ｙａｎｇ，Ｒ．Ｓｈｅｒｒｙ，Ｍ．Ｓ．Ｈｕｇｈｅｓ，Ｒ．Ｒｏｙａｌ，ｅｔ ａｌ．２００８．Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ ｍｅｌａｎｏｍａ：ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｅｎｓｉｖｅ ｍｙｅｌｏａｂｌａｔｉｖｅ ｃｈｅｍｏｒａｄｉａｔｉｏｎ ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ ｒｅｇｉｍｅｎｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｏｎｃｏｌｏｇｙ：ｏｆｆｉｃｉａｌ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ．２６：５２３３－９．
４．Ｗｒｚｅｓｉｎｓｋｉ，Ｃ．，Ｃ．Ｍ．Ｐａｕｌｏｓ，Ａ．Ｋａｉｓｅｒ，Ｐ．Ｍｕｒａｎｓｋｉ，Ｄ．Ｃ．Ｐａｌｍｅｒ，ｅｔ ａｌ．２０１０．Ｉｎｃｒｅａｓｅｄ ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ ｌｙｍｐｈｏｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｔｕｍｏｒ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｏｆ ａｄｏｐｔｉｖｅｌｙ ｔｒａｎｓｆｅｒｒｅｄ ｔｕｍｏｒ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ ｃｅｌｌｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．３３：１－７．
５．Ｄｕｒａｉ，Ｍ．，Ｃ．Ｋｒｕｅｇｅｒ，Ｚ．Ｙｅ，Ｌ．Ｃｈｅｎｇ，Ａ．Ｍａｃｋｅｎｓｅｎ，ｅｔ ａｌ．２００９．Ｉｎ ｖｉｖｏ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｏｆ ｔｕｍｏｒ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔｃｅｌｌｓ ｅｘｐａｎｄｅｄ ｕ

sing HLA-Ig based artificial antigen presenting cells (aAPC). Cancer immunology, immunotherap: CII. 58: 209-20.
6. Oelke, M., and J. P. Schneck. 2010. Overview of a HLA-Ig based "Lego-like system" for Tcell monitoring, modulation and expansion. Immunologic Research. 47: 248-56.
7. Smith-Garvin, J. E., G. a Koretzky, and M. S. Jordan. 2009. Tcell activation. Annual review of immunology. 27: 591-619.
8. Manolova, V., A. Flace, M. Bauer, K. Schwarz, P. Saudan, et al. 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. European Journal of Immunology. 38: 1404-13.
9. Fifis, T., A. Gamvrellis, B. Crimeen-Irwin, G. a Pietersz, J. Li, et al. 2004. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. Journal of Immunology. 173: 3148-54.
10. Champion, J. a, A. Walker, and S. Mitragotri. 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. Pharmaceutical research. 25: 1815-21.
11. Sharma, G., D. T. Valenta, Y. Altman, S. Harvey, H. Xie, et al. 2010. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. Journal of Controlled Release. 147: 408-412.
12. Astete, C. E., and C. M. Sabliov. 2006. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. Journal of biomaterials science. Polymer edition. 17: 247-89.
13. Florence, A. T. 2004. Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting. J. Drug Target. 12: 65-70.
14. Hubbell, J. a, S. N. Thomas, and M. a Swartz. 2009. Materials engineering for immunomodulation. Nature. 462: 449-60.
15. Anikeeva, N., T. Lebedeva, A. R. Clapp, E. R. Goldman, M. L. Dustin, et al. 2006. Quantum dot/peptide-MHC biosensors reveal strong CD8-dependent cooperation between self and viral antigens that augment the T cell response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103: 16846-51.
16. Mescher, M. F. 1992. Surface contact requirements for activation of cytotoxic T l

ymphocytes. Journal of Immunology. 149:2402-5.
17. Steenblock, E. R., S. H. Wrzesinski, R. a Flavell, and T. M. Fahmy. 2009. Antigen presentation on artificial acellular substrates:modular systems for flexible, adaptable immunotherapy. Expert opinion on biological therapy. 9:451-64.
18. Steenblock, E. R., and T. M. Fahmy. 2008. A comprehensive platform for ex vivo T-cell expansion based on biodegradable polymeric artificial antigen-presenting cells. Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy. 16:765-72.
19. Dal Porto, J., T. E. Johansen, B. Catipovic, D. J. Parfiit, D. Tuveson, et al. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90:6671-5.
20. Lebowitz, M. S., S. M. O'Herrin, a R. Hamad, T. Fahmy, D. Marguet, et al. 1999. Soluble, high-affinity dimers of T-cell receptors and class II major histocompatibility complexes:biochemical probes for analysis and modulation of immune responses. Cellular Immunology. 192:175-84.
21. Kunzmann, A., B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, et al. 2010. Toxicology of engineered nanomaterials:Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. Biochimica et biophysica acta. 1810:361-373.
22. Dobrovolskaia, M. a, and S. E. McNeil. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. Nature nanotechnology. 2:469-78.
23. Nune, S. K., P. Gunda, B. K. Majeti, P. K. Thallapally, and M. L. Forrest. 2011. Advances in lymphatic imaging and drug delivery. Advanced drug delivery reviews..
24. Hosken, N., K. Shibuya, A. Heath, and KM. 1995. The effect of antigen dose on CD4+T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. The Journal of. 182:20-22.
25. Alexander-Miller, M. a, G. R. Leggatt, A. Sa

rin, and J. a Berzofsky. 1996. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. The Journal of experimental medicine. 184:485-92.
26. Gonzalez, P. a, L. J. Carreno, D. Coombs, J. E. Mora, E. Palmieri, et al. 2005. Tcell receptor binding kinetics required for Tcell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102:4824-9.
27. Bullock, T. N. J., D. W. Mullins, and V. H. Engelhard. 2003. Antigen density presented by dendritic cells in vivo differentially affects the number and avidity of primary, memory, and recall CD8+ T cells. Journal of Immunology. 170:1822-9.
28. Mescher, M. F., F. E. Popescu, M. Gerner, C. D. Hammerbeck, and J. M. Curtsinger. 2007. Activation-induced non-responsiveness (anergy) limits CD8Tcell responses to tumors. Seminars in cancer biology. 17:299-308.
29. Newell, E. W., L. O. Klein, W. Yu, and M. M. Davis. 2009. Simultaneous detection of many T-cell specificities using combinatorial tetramer staining. 6.
30. Cai, S., Q. Yang, T. R. Bagby, and M. L. Forrest. 2011. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. Advanced drug delivery reviews. 63:901-08.
31. Dustin, M. L. 2008. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. Immunol. Rev. 221:77-89.
32. Chang, J. T., V. R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A. M. Intlekofer, et al. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. Science. 315:1687-91.
33. Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, and M. L. Dustin. 2006. Tcell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. Immunity. 25:117-127.
34. Lillemeier, B. F., M. a Mortelmaier, M. B. Forstner, J. B. Huppa, J. T. Groves, et al. 2010. TCR and Lat are expressed on separate pr

otein islands on T cell membranes and concatenate during activation. Nature Immunology. 11:90-6.
35. Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, et al. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nature materials. 8:543-57.
36. Fahmy, T. M., J. G. Bieler, M. Edidin, and J. P. Schneck. 2001. Increased TCR avidity after T cell activation:a mechanism for sensing low-density antigen. Immunity. 14:135-43.
37. Kumar, R., M. Ferez, M. Swamy, I. Arechaga, M. T. Rejas, et al. 2011. Increased Sensitivity of Antigen-Experienced T cells through the Enrichment of Oligomeric T cell Receptor Complexes. Immunity. 35:375-87.
38. Hillaireau, H., and P. Couvreur. 2009. Nanocarriers' entry into the cell:relevance to drug delivery. Cellular and Molecular lLfe Sciences. 66:2873-96.
39. Kocbek, P., N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, and J. Kristl. 2007. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. Journal of Controlled Release. 120:18-26.
40. Martinez-Martin, N., E. Fernandez-Arenas, S. Cemerski, P. Delgado, M. Turner, et al. 2011. Tcell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. Immunity. 35:208-22.
41. He, C., Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. Biomaterials. 31:3657-66.
42. Chithrani, B. D., A. a Ghazani, and W. C. W. Chan. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano letters. 6:662-8.
43. Chithrani, B. D., and W. C. W. Chan. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. Nano letters. 7:1542-50.
44. Cho, E. C., L. Au, Q. Zhang, and Y. Xia. 2010. The effects of size, shape, and surface functional group of gold nanostructures on

their adsorption and internalization by cells. Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). 6：517－22.
45. Maeda, H. 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature：the key role of tumor－selective macromolecular drug targeting. Advances in enzyme regulation. 41：189－207.
46. Greish, K. 2007. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors：a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. Journal of drug targeting. 15：457－64.
47. Rabinovich, G. a, D. Gabrilovich, and E. M. Sotomayor. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annual review of immunology. 25：267－96.
48. J. P. Schneck, J. E. Slansky, S. M. O'Herrin, T. F. Greten, Monitoring antigen－specific T cells using MHC－Ig dimers., Current protocols in immunology／edited by John E. Coligan. . . [et al.] Chapter17, Unit17. 2 (2001).
49. Y. －L. Chiu, J. P. Schneck, M. Oelke, HLA－Ig based artificial antigen presenting cells for efficient ex vivo expansion of human CTL., Journal of visualized experiments：JoVE, 1－5 (2011).

【0251】

実施例8。実施例9～13の材料及び方法

マウス及び試薬。2C TCRトランスジェニックマウスを、C57／BL6環境で飼育することによって、ヘテロ接合体として維持した。Pmel TCR／Thy1$^{a}$Rag－／－トランスジェニックマウスは、Nicholas Restifo (National Institutes of Health, Bethesda, MD) からの贈り物であり、ホモ接合体として維持された。C57BL／6jマウスはJackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した。全てのマウスを、Johns Hopkins Universityの治験審査委員会に従い維持した。蛍光標識されたモノクローナル抗体は、BioLegend (San Diego, CA) から購入した。

【0252】

MHC－Igダイマー及びナノaAPCの調製。可溶性MHC－Igダイマー、K$^{b}$－Ig及びD$^{b}$－Igを、調製し、記載の通り、ペプチドで充填した[8]。補足方法を参照されたい。ナノaAPCを、記載の通り、MHC－Igダイマー及び抗CD28抗体 (37. 51；BioLegend) のMACS Microbead (Miltenyi Biotec) との直接共役によって製造した。3ナノ粒子に結合するタンパク質を、補足方法で記載される通り、蛍光によって測定した。

【0253】

インビトロの細胞増殖。細胞を均質化されたマウス脾臓及びリンパ節から獲得し、続いて、RBCの低浸透圧性溶解。細胞傷害性リンパ球を、Miltenyi Biotec (Cologne, Germany) からのCD8ノータッチ単離キット及び磁気濃縮カラムを使用して単離した。CD44－ビオチン抗体を一次カクテルに添加して、CD44

ｌｏ、ナイーブ細胞を単離した。適用可能な場合、細胞を３７℃で１５分間、カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル（ＣＦＳＥ）で標識し、次いで、広範囲にわたって洗浄した。

【０２５４】

指示された用量でＣＤ８＋Ｔ細胞及びナノａＡＰＣを混合し、Ｔ細胞因子（ＴＦ）、刺激されたヒトＰＢＭＣから採取された条件培地のサイトカイン濃縮カクテルで補充された完全なＲＰＭＩ培地において、４～７日間、２４ウェル平底または９６ウェル丸底プレート中で培養した。$^{4\,6}$指示される場合、培養プレートを、1/4～3/4インチの長さの２つのネオジムＮ５２ディスク磁石（Ｋ＆Ｊ　Ｍａｇｎｅｔｉｃｓ，Ｊａｍｉｓｏｎ，ＰＡ）の間に固定した。ＣＦＳＥ蛍光を、ＢＤ　ＦａｃｓＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターを使用して、指示された時点で測定し、ＦｌｏｗＪｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ）において分析した。増殖倍率を、刺激の７日後に細胞計数によって評価した。内因性抗原特異的細胞の増殖を、活性化の７日後に４００ｎＭの蛍光標識されたＭＨＣ－Ｉｇダイマーで染色することによって評価した。

【０２５５】

粒子結合アッセイ。平衡粒子結合アッセイのため、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を、ＦＡＣＳ洗浄緩衝液（ＰＢＳ＋２％ＦＣＳ＋．０５％アジ化ナトリウム）における１０$^{7}$細胞／ｍｌの濃度で、４℃でインキュベートした。３０μｌの細胞のアリコートを、６０～９０分間、蛍光標識されたＭＨＣ－Ｉｇダイマーを担持する異なる濃度のナノ粒子で混合した。洗浄後、細胞結合蛍光をフローサイトメーターによって測定し、ＭＣＦ（平均チャネル蛍光）を、ＦｌｏｗＪｏを使用して計算した。

【０２５６】

粒子オフレート結合アッセイのため、細胞及び飽和用量のナノ粒子または可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマーを、上述の通り、定常状態に結合した。ＭＣＦを時間０で測定し、続いて、再結合を防止するために過剰クローン形質１Ｂ２遮断抗体を添加した。ＭＣＦを指示された時点で測定し、有効なオフレートをＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）における指数関数形崩壊のために計算した。細胞粒子接触を表２に記載される通り推定した。

【０２５７】

顕微鏡法。Ｔ細胞を４℃で６０分間、ナノａＡＰＣに結合した。細胞を、その後、ネオジムＮ５２ディスク磁石によって作り出された磁場の存在または不在下で、３７℃で、９６ウェルプレートに移行した。３０分後、細胞を洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８抗ＬＦＡ１、モノクローナルＰＥ抗マウスＩｇＧ１、及びＡｌｅｘａ６４７抗ＣＤ３εで、４℃で染色した。サンプルを洗浄し、２％のパラホルムアルデヒドで直ちに固定した。画像を、Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ　Ｓｃｈｏｏｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（ジョンズホプキンス医学部顕微鏡法施設）で、１００×倍率のＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ　５１０　ＭＥＴＡ（Ｚｅｉｓｓ，Ｏｂｅｒｋｏｃｈｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）レーザー走査共焦点上で得た。ＣＤ３εクラスタサイズを、内蔵型粒子分析装置を使用して、ＩｍａｇｅＪ（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）に書き込まれた粒子検出アルゴリズムを使用して、判定した。

【０２５８】

ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの調製。可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマー、Ｋ$^{b}$－Ｉｇ及びＤ$^{b}$－Ｉｇを調製し、記載の通り、ペプチドで充填した（Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．；Ｓｌａｎｓｋｙ，Ｊ．Ｅ．；Ｏ’Ｈｅｒｒｉｎ，Ｓ．Ｍ．；Ｇｒｅｔｅｎ，Ｔ．Ｆ．Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ　Ａｎｔｉｇｅｎ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｔ　Ｃｅｌｌｓ　Ｕｓｉｎｇ　ＭＨＣ－Ｉｇ　Ｄｉｍｅｒｓ．Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００１，Ｃｈａｐｔｅｒ　１７，Ｕｎｉｔ　１７．２）。簡潔に、Ｋ$^{b}$－Ｉｇ分子を、アルカリ条件（ｐＨ１１．５）で取り除くことによって、ペプチドで充填し、次いで、５０倍の過剰ペプチドの存在下で再び折り畳んだ。Ｄ$^{b}$－Ｉｇ分子を、弱酸性条件下で（ｐＨ６．５）取り除き、５０倍のモル過剰ペプチド及び２倍のモル過剰のヒトβ$_{2}$－ミクログロブリンの存在下で再

び折り畳んだ（Ｃｈｉｕ，Ｙ．－Ｌ．；Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．；Ｏｅｌｋｅ，Ｍ．ＨＬＡ－Ｉｇ Ｂａｓｅｄ Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｅｘ Ｖｉｖｏ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ ＣＴＬ．Ｊ．Ｖｉｓ．Ｅｘｐ．２０１１，１－５）。ペプチドＳＩＹ（ＳＩＹＲＹＹＧＬ、合成、配列番号３）、ＳＩＩＮ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ、卵白アルブミンタンパク質に由来、配列番号４）、ＧＰ１００（ＫＶＰＲＮＱＤＷＬ、メラニン形成細胞ＧＰ１００タンパク質から、配列番号５）、及びＡＳＮ（ＡＳＮＥＮＭＥＴＨ、インフルエンザＡ核タンパク質から、配列番号６）は、Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）から購入した。タンパク質濃度を、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって、標識後に判定した。

【０２５９】

ミクロａＡＰＣ合成。ミクロａＡＰＣを（Ｏｅｌｋｅ，Ｍ．；Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ａ ＨＬＡ－Ｉｇ Ｂａｓｅｄ“Ｌｅｇｏ－Ｌｉｋｅ Ｓｙｓｔｅｍ”ｆｏｒ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ，Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１０，４７，２４８－５６）、タンパク質の４．５μｍのＤｙｎａｌ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）との直接化学結合によって、以前に記載した通り、作製した。初期の結合ステップのため、２５μｇの抗ビオチン抗体（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を、０．１Ｍのホウ酸ナトリウム緩衝液において１００００万個のミクロビーズに添加した。磁気カラム中で洗浄した後、ビオチン標識したＭＨＣ－Ｉｇ及びＣＤ２８を等モル量において添加して、ａＡＰＣを形成した。

【０２６０】

ナノ粒子トラッキング分析。高感度ＣＣＤカメラを装備するＮａｎｏｓｉｇｈｔ ＬＭ１０を、ＮＴＡによって、ナノａＡＰＣのサイズ分布を特性評価するために使用した。５０μＬの希釈ナノ粒子溶液を、４０５ｎｍのレーザー源に接続された試料室中に充填した。散乱重心（粒子）のＢｒｏｗｎｉａｎ運動トラッキングを含む６０秒の動画を、ＮＴＡソフトウェア（バージョン２．０）を使用して録画した。動画を、推奨される通りのゲイン、ぼかし、及び輝度の手動調節を伴う製造業者が推奨する自動設定を使用して処理した。ナノ粒子溶液を、リン酸緩衝食塩水中で希釈して、試料濃度を$5\times10^{12}$粒子$mL^{-1}$に調節した。

【０２６１】

ミクロａＡＰＣ顕微鏡法。Ｔ細胞をミクロａＡＰＣとともにインキュベートし、１分間１０００ＲＰＭで回転させて、細胞及び粒子を詰め、４℃で６０分間、インキュベートした。細胞を、その後、ネオジムＮ５２ディスク磁石によって作り出された磁場の存在または不在下で、３７℃で、９６ウェルプレートに移行した。３０分後、細胞を洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８抗ＬＦＡ１、モノクローナルＰＥ抗マウスＩｇＧ１、及びＡｌｅｘａ６４７抗ＣＤ３εで、４℃で染色した。サンプルを洗浄し、２％のパラホルムアルデヒドで直ちに固定した。画像を、Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｓｃｈｏｏｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｆａｃｉｌｉｔｙ（ジョンズホプキンス医学部顕微鏡法施設）で、１００×倍率のＺｅｉｓｓ ＬＳＭ ５１０ ＭＥＴＡ（Ｚｅｉｓｓ，Ｏｂｅｒｋｏｃｈｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）レーザー走査共焦点上で得た。ＣＤ３εクラスタサイズを、内蔵型粒子分析装置を使用して、ＩｍａｇｅＪ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ）に書き込まれた粒子検出アルゴリズムを使用して、判定した。粒子に結合する細胞のための粒子自己蛍光を手動で除去した。

【０２６２】

インビボのＴ細胞増殖及び皮下腫瘍成長の阻害に対するナノａＡＰＣの影響。ＣＤ４４ｌｏ、ＣＤ８＋細胞を、磁気濃縮カラムを使用して、ｐｍｅｌ脾臓及びリンパ節から単離し、上述の通り、磁場の存在または不在下で、２４時間活性化した。$1\times10^{6}$ Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ細胞を、Ｂ６Ｔｈｙ１．２＋野生型宿主に養子移植した（ｎ＝１群当たり６匹のマウス）。マウスを、３０，０００単位腹腔内ＩＬ－２での養子移植の日及びそ

の翌日の両方に処置した。養子移植の７及び２０日後、１群当たり３匹のマウスを屠殺し、リンパ球を末梢血、脾臓、及び鼠径部、子宮、及び腋窩リンパ節から単離し、次いで、抗Ｔｈｙ１．１抗体で染色した。

【０２６３】

３×１０$^{5}$　Ｂ１６メラノーマ細胞を、Ｔ細胞養子移植より１０日前に皮下に注射したことを除いては、腫瘍拒絶実験を上の通りに実施した。照射誘導されたリンパ球減少症は、免疫抑制性宿主細胞を除去し、リンパ増殖性サイトカインの競合を低減し、$^{35}$臨床治験におけるメラノーマに対する免疫療法の作用を有意に向上させると考えられるので、一過性リンパ球減少症を、ＭＳＤ　Ｎｏｒｄｉｏｎ　Ｇａｍｍａｃｅｌｌ二重Ｃｓ１３７供給源（Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｃｅｎｔｅｒ）での養子移植の１日前の亜致死照射（５００ｃＧｙ）によって誘導した。$^{36}$動物が安楽死させられる、腫瘍サイズが約１５０ｍｍ$^{2}$になるまで、デジタルキャリパーを使用して、腫瘍成長を２日の間隔で監視した。

【０２６４】

実施例９。ナノａＡＰＣは、優先的に、活性化Ｔ細胞を刺激する

Ｔ細胞刺激は、内因性ＡＰＣによって送達される２つの活性化シグナル、すなわち、シグナル１、ＴＣＲと結合するＭＨＣとの関連で提示される同族抗原ペプチド、及びシグナル２、Ｔ細胞応答を調節するいくつかの共刺激受容体のうちの１つ、を必要とする。２２ナノａＡＰＣを、キメラＭＨＣ－Ｉｇダイマー（シグナル１）及び抗ＣＤ２８抗体（シグナル２）を、５０～１００ｎｍの常磁性鉄デキストランナノ粒子に結合することによって、合成し（図９Ａ）、それは、それらの広範囲な特性評価及び生体適合性のため、ナノスケール粒子プラットフォームとして選択された。２３粒子に結合するタンパク質を、対象のタンパク質に対する蛍光抗体で標識することによって特性評価した（図１３）。ナノａＡＰＣは、９６±１０及び９２±１２タンパク質／μｍ２それぞれのタンパク質密度に対して、粒子当たり１３±３ＭＨＣ－Ｉｇダイマー及び１２±５抗ＣＤ２８抗体を示す（表１）。

【表１】

表１

| 粒子 | 粒子平均粒径（μｍ） | 粒子当たりのＭＨＣ－Ｉｇダイマー | ＭＨＣ－Ｉｇ密度(タンパク質／μｍ$^{2}$) | 粒子当たりの抗ＣＤ２８ | 抗ＣＤ２８密度(タンパク質／μｍ$^{2}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| ナノａＡＰＣ | ０．１ | １３±３ | ９６±１０ | １２±５ | ９２±１２ |
| Ｋｂ－ＳＩＹ | ０．１ | ２９±６ | ２１４±１２ | －－ | －－ |
| Ｋｂ－ＳＩＹ単独ナノ粒子 | ０．１ | ２９±６ | ２１４±１２ | －－ | －－ |
| ミクロＨＤ | ４．５ | ４９，９００±２８００ | １９６±１１ | ２７，２００±４６００ | １０７±１８ |
| ミクロＬＤ | ４．５ | １５，３００±１０００ | ６０±１１ | １４，４００±４５００ | ５６±１７ |

【０２６５】

ミクロ（細胞サイズの）及びナノａＡＰＣの表面上のＭＨＣ－Ｉｇ及び抗ＣＤ２８の量及び密度。タンパク質を図１３の説明に記載される通り、定量化し、粒子濃度を、計数（ミクロａＡＰＣ）またはナノ粒子トラッキング分析（ナノａＡＰＣ）によって判定した。高（ＨＤ）及び低（ＬＤ）密度粒子を、合成の間の粒子当たりの異なる量のタンパク質によって合成した。シグナル１ナノ粒子を、抗ＣＤ２８を伴わずに合成した。

【０２６６】

ナイーブ対以前に活性化されたＴ細胞の刺激を比較するために、我々は、ｐｍｅｌ　ＴＣＲまたは２Ｃ　ＴＣＲトランスジェニックマウスのいずれかから単離されたＣＤ４４枯渇ナイーブＣＤ８＋脾細胞を使用した（図１４Ａ）。この技法は、我々に、定義された抗原特異性を有する真のナイーブＴ細胞を単離させたが、一方では、我々の以前の研究[3]及び他の人々の研究[24、25]は、トランスジェニックマウスにおいて見出されるＣＤ４４陰性及びＣＤ４４高、ナイーブ及びメモリ、細胞の混合集団に依存した。可溶性ペプチドで、ｐｍｅｌ　Ｔ細胞ではＧＰ１００、及び２Ｃ　Ｔ細胞ではＳＩＹで、７日間、ＣＤ８＋脾細胞を刺激することによって、活性化細胞を生成した。

【０２６７】

８ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇを提示する低用量のナノａＡＰＣでの刺激の３日後、ナイーブｐｍｅｌ　Ｔ細胞は、ＣＦＳＥ（図９Ｂ、左）、各細胞分裂で希釈された生体染色色素によって測定されたとき、増殖しなかった。しかしながら、同一の用量では、活性化細胞は堅固に増殖した（図９Ｂ、右）。ナノａＡＰＣ滴定は、ナイーブ細胞が、ナノａＡＰＣ誘導された増殖（８～１０ｎｇの合計ＭＨＣ－Ｉｇ）の、活性化細胞（１．５ｎｇ未満の合計ＭＨＣ－Ｉｇ）よりも高い閾値を有することを示した（図９Ｃ）。

【０２６８】

ａＡＰＣサイズの制御として、我々は、細胞サイズの４．５μｍ直径の鉄デキストランミクロａＡＰＣによって誘発されたＴ細胞増殖を評価した。ミクロａＡＰＣは、７日目のおおよそ１０～２０倍の増殖（図１４Ｃ）を伴い、３日目のＣＦＳＥ希釈（図１４Ｂ）によって測定される通り、ナノａＡＰＣよりも低い用量（１．５～８ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇ）で、ナイーブＴ細胞増殖を誘導した。

【０２６９】

したがって、活性化細胞はナノａＡＰＣ及びミクロａＡＰＣに同等に応答するが、ナイーブ細胞は、ナノａＡＰＣに基づく刺激のより高い閾値を有する。ナノ粒子系ａＡＰＣより高い密度（ＨＤ）及び低い密度（ＬＤ）を有するミクロａＡＰＣは、合計ＭＨＣ－Ｉｇのために正規化したときに（図１４Ｄ及び図１４Ｅ）、同一の増殖を誘導したので、この違いは、ミクロａＡＰＣとナノａＡＰＣとの間のタンパク質密度の違いによって引き起こされたのではなかった。応答は粒子サイズに敏感なので、我々は、応答の違いが、ナイーブ対活性化細胞上のＴＣＲナノクラスタとのナノ粒子相互作用における違いに起因したと仮定した。

【０２７０】

実施例１０。ナノａＡＰＣはナイーブ細胞よりも活性化細胞上で多くのＴＣＲと結合する。

ＴＣＲに結合するナノ粒子を検査するために、我々は、ＭＨＣ－Ｉｇ単独を担持し、したがって、抗ＣＤ２８の結合貢献を除去するナノ粒子を合成した。結合実験を、ナイーブ及び活性化Ｔ細胞上で実施し、それは、同族ＭＨＣ－Ｉｇを特に担持し、低バックグラウンドを有するナノ粒子と結合する（図７Ａ）。

【０２７１】

ナノ粒子は、均衡にナイーブ及び活性化細胞に結合し、続いて、抗クローン形質１Ｂ２遮断抗体を添加して、再結合を防止した。ナノ粒子は、活性化細胞（９８４秒±２２１）よりも早いナイーブ細胞（５３１秒±１４９の半減期）からの解離を示した（対応スチューデントｔ検定によりｐ＜０．０２）（図９Ｄ、表２）。

【表２】

表２

| リガンド | Ｔ細胞 | オフレート（ｓ$^{-1}$）Ａ | 半減期（秒）Ｂ | ＴＣＲ－ＭＨＣ接触Ｃ |
|---|---|---|---|---|
| ＭＨＣ－Ｉｇダイマー | ナイーブ | ８．９×１０$^{-3}$ | ７８ | １ |
| | 活性化 | ５．２×１０$^{-3}$ | １１２ | １．７ |
| ナノ粒子 | ナイーブ | （２．０±０．５）×１０$^{-3}$ | ５３１±１４９** | ６．８ |
| | 活性化 | （０．９±０．２）×１０$^{-3}$ | ９８４±２２１** | １２．６ |

Ａオフレート実験を、ナイーブまたは活性化２Ｃ　ＴＣＲトランスジェニックＴ細胞を、ＡＰＣ標識されたＭＨＣ－ＩｇまたはＫ$^{b}$－ＳＩＹ単独を担持するＡＰＣ標識されたナノ粒子とともにインキュベートすることによって実施した。４℃で１時間のインキュベーションの後、細胞を洗浄し、時間０蛍光測定がなされ、１Ｂ２、抗クローン形質抗体を添加して、再結合を防止した。次いで、蛍光測定を２～１０分の間隔で繰り返した。オフレートを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにおける一次元指数関数適合から計算した。

Ｂ半減期は、カラムＡにおけるオフレートに由来した。活性化細胞に結合する粒子は、ナイーブ細胞に結合する粒子より有意に長い半減期を有した（測定が実験によって対応された対応ｔ－試験によって＊＊ｐ＜０．０２）。３つの実験を各条件に対して実施した。

ダイマーまたは粒子のいずれか上の個別のＭＨＣ－ＩｇのＣ非結合は、ポアソン（別名メモリ無しまたは指数関数）過程として確率的にモデル化され得る。速度定数ｒを有するポアソン過程のために、ｎ番目の事象の出発時間は、形状パラメータｎ及び単事象速度パラメータｒを伴うγ分布を特徴とする。

【数１】

$$f_n(t) = r^n \frac{t^{n-1}}{(n-1)!} e^{-rt}, 0 \le t < \infty$$

この分布の平均Ｅ［ｔ］＝ｎ／ｒ。ＭＨＣ－Ｉｇダイマーが、ナイーブＴ細胞と１回接触すると想定される場合（Ｆａｈｍｙ，Ｔ．Ｍ．；Ｂｉｅｌｅｒ，Ｊ．Ｇ．；Ｅｄｉｄｉｎ，Ｍ．；Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．Ｉｎｃｒｅａｓｅｄ　ＴＣＲ　Ａｖｉｄｉｔｙ　ａｆｔｅｒ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ：ａ　Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ　ｆｏｒ　Ｓｅｎｓｉｎｇ　Ｌｏｗ－Ｄｅｎｓｉｔｙ　Ａｎｔｉｇｅｎ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２００１，１４，１３５－４３）、ｒは、ナイーブ細胞上のＭＨＣ－Ｉｇのオフレートから推定され得る（８．９×１０$^{-3}$）。したがって、任意の所与の条件では、Ｅ［ｔ］は、ナイーブまたは活性化細胞上のＭＨＣ－Ｉｇダイマーまたは粒子の半減期に由来し（ｔ1/2）、ｒは定数であると想定される。ＴＣＲ－ＭＨＣ接触の数はｎとして推定される。

【数２】

$$n = \frac{t_{1/2} * r}{\ln(2)}$$

ＭＨＣ－Ｉｇがナイーブ細胞と２回以上の接触をする可能性が高いので、接触の真の数は、この推定よりも高い可能性がある。

【０２７２】

解離率を使用して、細胞と多価リガンドとの間の接触の数を推定し得、より多くの接触がより緩徐な解離をもたらす。[26]細胞からのナノ粒子解離は、パラメータを得、手法を検証するために使用される可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマーの解離を伴う指数関数的確率過程としてモデル化された（詳細は表２を参照）。単一ＴＣＲ－ＭＨＣ接触のオフレートを、

効果的に一価である、ナイーブ細胞に結合する可溶性ＭＨＣ－Ｉｇダイマーのために測定した（図７Ｃ）。[13]予想した通り、ＭＨＣ－Ｉｇダイマーは、活性化細胞からより緩徐に解離し、１．７回の推定された接触を引き起こし（図９Ｅ）、以前の報告と一致している。[13、26]

【０２７３】

ナイーブ細胞からのナノ粒子解離は、遊離ＭＨＣ－Ｉｇよりも有意に遅く（図７Ｃ）、ナイーブよりも活性化細胞からは２倍遅かった。したがって、ナノａＰＣは、活性化細胞でのおおよそ２倍（１２．６）と比較して（図９Ｅ、表２）、ナイーブ細胞と推定６．８回の接触をした。これらの数は、ナノａＰＣの表面に付着した１１％及び２２％のＭＨＣ－Ｉｇダイマー、それぞれを表す。

【０２７４】

活性化細胞は、幅広い範囲の粒子濃度にわたって、ナイーブ細胞より２倍少ない平衡状態のナノ粒子と結合した（図９Ｆ）。この違いは、ナイーブ及び活性化Ｔ細胞上で同等であった（図７Ｂ）Ｔ細胞受容体発現に起因せず、粒子当たりのＴＣＲ－ＭＨＣ接触の増加がより少ない利用可能なＴＣＲをもたらすことを示し、結合を阻止し、個別のクラスタに結合するナノ粒子の総量を制限する。

【０２７５】

共に、結合する合計ナノａＰＣの２倍の増加及びナイーブ細胞によって関与されるＴＣＲ－ＭＨＣ接触の２倍の減少は、図９Ｇで模式的に示される結合モデルを示唆する。ナイーブ細胞は、細胞－ナノ粒子接触より前に小規模のＴＣＲクラスタのために、より少ないＭＨＣ接触を用いて、より多くのナノａＰＣと結合する。対照的に、活性化細胞は、各粒子がより多くのＴＣＲと接触するので、より少ないナノ粒子と結合する。

【０２７６】

実施例１１。磁場はａＰＣ及びＴＣＲ／ＣＤ３の凝集を引き起こす

ナノスケールＴＣＲクラスタに結合したナノａＰＣという仮定に基づいて、我々は、対照ＴＣＲクラスタ凝集に結合するナノ粒子、ひいてはＴ細胞活性化を活用した。外来磁場を使用して、ナイーブ細胞に結合した常磁性ナノａＰＣの凝集を引き起こした。ナノａＰＣを、４℃でナイーブＴ細胞に結合し、次いで、０．２Ｔの最大磁場強度を作り出す２つのネオジムディスク磁石の間で、３７℃で培養して、外部磁場において、常磁性鉄デキストランａＰＣが磁気的に偏極され、互いに引きつけられているかどうかを判定し、[27]ＴＣＲの凝集を引き起こす（図１０Ａ～Ｃ）。

【０２７７】

クラスタ形成を共焦点顕微鏡法によって評価した。４℃で１時間の結合の後、我々は、直ちに細胞を染色及び固定するか（時間０）、または磁場の不在または存在下で、３０分間、３７℃のインキュベーターに細胞を移行するかのいずれかを行った。次いで、細胞をＬＦＡ－１に対する抗体（緑色）、すなわち、対照として使用される接着分子、ＣＤ３ε（深紅色）、すなわち、ＴＣＲに関連するシグナル伝達構成要素、及びＭＨＣ－Ｉｇ（赤色）で染色して、ナノａＰＣを可視化した。最後に、細胞を固定し、画像表示した。

【０２７８】

３７℃でのインキュベーションより前に、ａＰＣ及びＣＤ３εを、細胞表面のいたる所で、拡散的に分布した小さなクラスタを伴い、膜上の点状パターンで分布した（時間０、図１０Ｄ上段左）。ＬＦＡ－１を細胞のいたる所に均一に分布した。ＬＦＡ－１及びＣＤ３ε染色パターンは、非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ粒子を伴う３０分間のインキュベーションの後の時間０でのものと同一であった（非同族、図１０Ｄ上段右）。磁場の不在下で、同族ナノａＰＣを伴うインキュベーションは、ＬＦＡ－１、ａＰＣ、またはＣＤ３εのいずれかの分布を劇的には変化させなかった（磁石無し、図１０Ｄ下段左）。しかしながら、磁場で３０分後、ナノａＰＣの大きな凝集を膜上に形成した（磁石、図１０Ｄ下段右）。ナノａＰＣのこれらのクラスタは、ＣＤ３εの同様のサイズのクラスタと共存した。対照分子ＬＦＡ－１は膜のいたる所に拡散パターンを維持し、ＣＤ３ε凝集がａＰＣとのその関連に起因したことを示す。

【０２７９】
ａＡＰＣによって誘導された凝集のサイズ及び数を特性評価するために、粒子特定プログラムがＩｍａｇｅＪにおいて開発された。プログラムは、時間０細胞からの拡散、点状クラスタ（図１０Ｅ左）、及び磁場によって誘導されたより大きな凝集（図１０Ｅ右）の両方を特定することができた。
【０２８０】
磁場におけるインキュベーションは、ナノａＡＰＣ単独を伴うインキュベーションの後に見られるものを超えて、ＴＣＲ凝集を有意に増加させ、より大きなＣＤ３複合体が細胞上に凝集するという結果をもたらした。３７oＣでのインキュベーションより前の平均クラスタ領域は０．３０±０．０３μｍ２であり、これは非同族ナノａＡＰＣを伴うインキュベーション後に変化しなかった（図１０Ｆ）。ａＡＰＣ単独は、クラスタサイズを０．５２±０．０６μｍ２の平均に増加させた（ｐ＜０．００１）。クラスタ形成は磁場において０．７３±０．１１μｍ２の平均サイズにさらに向上された（磁石無しと比較してｐ＜０．００１）。細胞当たりのクラスタの平均数は、時間０の６．５±０．６から磁場を伴い３．０±０．２に減少した（図１０Ｇ）。磁場における培養後のナノａＡＰＣ解離率は増加せず（図７Ｆ）、凝集形成は、ＴＣＲ／ＭＨＣ接触の増加に関連しないが、むしろａＡＰＣに結合したＴＣＲナノクラスタの凝集に関連することを示唆する。
【０２８１】
外部磁場の影響もミクロａＡＰＣを使用して研究した（図８Ａ）。ミクロａＡＰＣ凝集を引き起こす磁場を適用する間、ミクロａＡＰＣの凝集は細胞上のＴＣＲ／ＣＤ３の凝集に関連しなかった。Ｔ細胞上のＣＤ３クラスタは、磁場の不在下で、ミクロａＡＰＣとともにインキュベートされたときの領域において０．３９±０．０３μｍ２であり、磁場の存在下で、ミクロａＡＰＣを伴い、０．３７±０．０３μｍ２（図８Ｂ～Ｃ）であり、Ｔ細胞をミクロａＡＰＣで刺激したときに磁場はＣＤ３クラスタ形成を向上させなかったことを示す。これは、ＴＣＲナノクラスタに対してより大きいサイズのミクロ粒子に起因する可能性が高い。
【０２８２】
要するに、磁場によって誘導された、ミクロａＡＰＣ凝集ではなくナノａＡＰＣ凝集は、ＴＣＲ／ＣＤ３凝集サイズの２倍の増加及び細胞当たりの凝集の数の２倍の減少をもたらした。受容体凝集は、Ｔ細胞活性化の強いかつ十分なシグナルであると知られているので、[28]我々は、磁石誘導されたＴＣＲクラスタ形成のＴ細胞増殖に対する影響を検査した。
【０２８３】
実施例１２。磁場における活性化はナイーブＴ細胞の増殖を向上させる
ナノａＡＰＣによるＴ細胞の活性化が磁場における培養によって向上されたかどうかを評価するために、ＣＦＳＥ標識されたｐｍｅｌ　Ｔ細胞を、漸増用量のＤｂ－ＧＰ１００ナノａＡＰＣとともにインキュベートし、外部磁場を伴うか、または伴わずに培養した。ナイーブＴ細胞は、別途最小増殖を誘導した用量のナノａＡＰＣで、磁場において増殖した（図１１Ａ）。５ｎｇのＭＨＣ－Ｉｇを担持するナノａＡＰＣを伴うインキュベーションの後、磁場における８９％の細胞と比較して、培養における２９％の細胞が増殖した。７日目の増殖は、磁石無し対照と比較して、最大４倍多かった（図１１Ｂ）。ナノａＡＰＣを伴わない磁場における培養はＴ細胞増殖をもたらさなかった。
【０２８４】
対照的に、磁場におけるミクロａＡＰＣを伴う培養は、３日目のＣＦＳＥ希釈及び７日目の増殖の両方によって測定したとき、磁石無し対照と比較して、向上したＴ細胞増殖をもたらさなかった（図８Ｄ～Ｅ）。
【０２８５】
磁気ビーズクラスタ形成を以前から使用して、他の系における機械的ストレス[29]及び受容体クラスタ形成[21、27]の両方の影響を研究し、役割はＴＣＲの機械的誘発のために提案されてきた。[30、31]しかしながら、磁場におけるミクロａＡＰＣは、ナノａＡ

ＰＣよりも大きな機械的力を伝達するが、ＴＣＲ凝集または向上した増殖を誘導しない可能性が高いので、ナノａＡＰＣで見られる磁石向上増殖作用は、機械的受容体「引きつけ」よりもむしろ受容体凝集に起因する可能性が高い。

【０２８６】

ナノａＡＰＣによる最適増殖のために必要とされる磁場刺激の持続期間及び強度を、異なるサイズのネオジム磁石の添加及び除去によって評価した。磁場において１～３時間（図１１Ｃ～１１Ｄ）及び０．２Ｔ以上の磁場強度（図１１Ｅ～３Ｆ、図１３）は、１週間後に１０倍のＴ細胞増殖を引き起こした。

【０２８７】

磁場向上ａＡＰＣ刺激はまた、内因性、ポリクローナルＴ細胞集団からの抗原特異的Ｔ細胞の増殖を向上させた。我々は、Ｔｒｐ２メラノーマ抗原に特異的なＴｒｐ２ペプチドで充填されたＫｂ－Ｉｇダイマーを担持するナノａＡＰＣを合成した。野生型Ｂ６マウスからのＣＤ８＋脾細胞を、制限用量のａＡＰＣで培養し、７日後、抗原特異的Ｔ細胞を分析した。この用量でのナノａＡＰＣ単独増殖は、同族Ｋｂ－Ｔｒｐ２結合と非同族Ｋｂ－ＳＩＩＮＦ結合とを比較することによって判定される通り、０．７０％のＴｒｐ２特異的細胞をもたらした（図１１Ｇ）。しかしながら、磁場においてＴ細胞とともにインキュベートする場合、ａＡＰＣは単一週後におおよそ３．４％の抗原特異的Ｔ細胞を生成した（図１１Ｇ）。これは、磁場無しの６７００±６３０と比較して、磁場における１０×$10^6$の前駆体細胞のプールから生成されたおおよそ３７，０００±３，９００のＴｒｐ－２特異的細胞をもたらした（おおよそ５．５倍の差、スチューデントｔ検定によってｐ＜０．０１）。ＣＤ８前駆体発生頻度は１０００万当たり約１０～８００であると推定されるので[32]、これは、インビボのウイルス感染で見られる１０００倍の前駆体増殖に相当する、磁場での培養において４５０～３，６００倍の増殖を示唆する。[33]

【０２８８】

実施例１３。養子免疫治療のための磁場向上Ｔ細胞活性化

抗原特異的細胞の刺激を向上させる可能性により我々はインビボの養子移植より前の磁場向上ａＡＰＣ刺激を研究した。Ｔｈｙ１．１＋ｐｍｅｌ　Ｔ細胞を、磁場の存在または不在下で、ａＡＰＣで、インビトロで活性化し、野生型Ｔｈｙ１．２＋レシピエントマウスに養子移植した（概略図１２Ａ参照）。養子移植の７または２１日後にマウスを屠殺し、養子移植Ｔｈｙ１．１＋細胞を評価した。

【０２８９】

磁場向上ナノａＡＰＣ刺激は移植されたＴ細胞集団の堅固な増殖をもたらした。７日目、脾臓における３．１％のＴ細胞は、ａＡＰＣを伴うが磁場無しで刺激された細胞の０．６％及び養子移植より前に刺激されなかった未処置Ｔ細胞単独の０．２％と比較して、磁場において刺激されたＴ細胞ではＴｈｙ１．１＋であった（ｐ＜０．０１、図１２Ｂ～Ｃ）。最大割合の細胞が７日目に脾臓で観察された（図１２Ｃ）。検査された全ての臓器における合計Ｔｈｙ１．１＋細胞は、磁石無し群の２×$10^5$未満と比較して、７日目の磁場向上群（図１２Ｄ）でおおよそ１×１０６に到達した。この５倍の向上は、インビトロで見られる向上と大体一致した。より少ない細胞が２１日目に見られたが、磁場においてａＡＰＣで活性化されたＴ細胞は、ａＡＰＣ単独によって活性化されたＴ細胞からの０．０４％及び全く刺激されなかった細胞からの０．０１％と比較して、リンパ節における検出可能な集団を確立した（０．１５％）（ｐ＜０．０５、図１２Ｂ～Ｄ）。

【０２９０】

磁場向上Ｔ細胞刺激の機能的影響は、Ｂ１６メラノーマ、免疫拒絶の高い閾値を有する低免疫原性腫瘍の処置によって研究された。[34]Ｐｍｅｌ　Ｔ細胞を、腫瘍注射の１０日後に、確立された皮下Ｂ１６腫瘍を保有するマウスに養子移植し（図１２Ｅ）、一過性リンパ球減少症を、養子免疫治療への標準手法の通り、養子移植の１日前のマウスの亜致死照射（５００ｃＧｙ）によって誘導した。[35、36]

【０２９１】

磁場においてａＡＰＣで活性化された腫瘍特異的Ｔ細胞は、未処置対照、Ｔ細胞単独、

及び磁場無しでａＡＰＣによって刺激されたＴ細胞と比較して、腫瘍成長を堅固に阻止した（ｐ＜０．０００１二元ＡＮＯＶＡによる処置効果、図１２Ｆ）。１８日目に、磁場向上Ｔ細胞で処置されたマウスは、未処置または磁石無しＴ細胞で処置されたマウスより８～１０倍小さな腫瘍を有した。同様に、磁場向上Ｔ細胞は、宿主の生存を有意に改善し、注射後２８日目に６／８のマウスが生存し、４／８が検出可能な腫瘍を有しなかった（ｐ＜０．００１、マンテルーコックス図１２Ｆ）。

参考文献

1．Ｆａｙ，Ｆ．；Ｓｃｏｔｔ，Ｃ．Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ２０１１，３，３８１－３９４．

2．Ｍｏｏｎ，Ｊ．Ｊ．；Ｈｕａｎｇ，Ｂ．；Ｉｒｖｉｎｅ，Ｄ．Ｊ．Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｎａｎｏ－ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｔｏ Ｔｕｎｅ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ａｄｖ．Ｍａｔｅｒ．２０１２，２４，３７２４－４６．

3．Ｐｅｒｉｃａ，Ｋ．；Ｌｅｏｎ Ｍｅｄｅｒｏ，Ａ．Ｄｅ；Ｄｕｒａｉ，Ｍ．；Ｃｈｉｕ，Ｙ．Ｌ．；Ｂｉｅｌｅｒ，Ｊ．Ｇ．；Ｓｉｂｅｎｅｒ，Ｌ．；Ｎｉｅｍｏｌｌｅｒ，Ｍ．；Ａｓｓｅｎｍａｃｈｅｒ，Ｍ．；Ｒｉｃｈｔｅｒ，Ａ．；Ｅｄｉｄｉｎ，Ｍ．；ｅｔ ａｌ．Ｎａｎｏｓｃａｌｅ Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ２０１３，１０，１１９－２９．

4．Ｌｕｘｅｍｂｏｕｒｇ，ａ Ｔ．；Ｂｒｕｎｍａｒｋ，Ａ．；Ｋｏｎｇ，Ｙ．；Ｊａｃｋｓｏｎ，Ｍ．Ｒ．；Ｐｅｔｅｒｓｏｎ，Ｐ．ａ；Ｓｐｒｅｎｔ，Ｊ．；Ｃａｉ，Ｚ．Ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔｓ ｆｏｒ Ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ Ｎａｉｖｅ ＣＤ８＋Ｔ Ｃｅｌｌｓ Ｖｉａ Ｓｉｇｎａｌ １ Ａｌｏｎｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９８，１６１，５２２６－３５．

5．Ｒｏｇｅｒｓ，Ｊ．；Ｍｅｓｃｈｅｒ，Ｍ．Ｆ．Ａｕｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｎｄ Ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｕｍｏｒ Ｇｒｏｗｔｈ ｂｙ Ｌａｒｇｅ Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９２，１４９，２６９－７６．

6．Ｍｏｔｔａ，Ｉ．；Ｌｏｎｅ，Ｙ．Ｃ．；Ｋｏｕｒｉｌｓｋｙ，Ｐ．Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｎａｉｖｅ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｗｉｔｈ Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｄ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＭＨＣ Ｃｌａｓｓ Ｉ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ Ｃｏａｔｅｄ ｏｎｔｏ Ｂｅａｄｓ：Ｒｏｌｅ ｏｆ ＴＣＲ／ｌｉｇａｎｄ Ｄｅｎｓｉｔｙ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９８，２８，３６８５－９５．

7．Ｍｅｒｗｅ，Ｐ．Ａ．ｖａｎ ｄｅｒ；Ｄｕｓｈｅｋ，Ｏ．Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｆｏｒ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｔｒｉｇｇｅｒｉｎｇ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１０，１１，４７－５５．

8．Ｏｅｌｋｅ，Ｍ．；Ｍａｕｓ，Ｍ．Ｖ；Ｄｉｄｉａｎｏ，Ｄ．；Ｊｕｎｅ，Ｃ．Ｈ．；Ｍａｃｋｅｎｓｅｎ，Ａ．；Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．Ｅｘ Ｖｉｖｏ Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｇｅｎ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ Ｃｅｌｌｓ ｂｙ ＨＬＡ－Ｉｇ－Ｃｏａｔｅｄ Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ Ａｎｔｉｇｅｎ－Ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２００３，９，６１９－２４．

9．Ｕｇｅｌ，Ｓ．；Ｚｏｓｏ，Ａ．；Ｓａｎｔｏ，Ｃ．Ｄｅ；Ｌｉ，Ｙ．；Ｍａｒｉｇｏ，Ｉ．；Ｚａｎｏｖｅｌｌｏ，Ｐ．；Ｓｃａｒｓｅｌｌｉ，Ｅ．；Ｃｉｐｒｉａｎｉ，Ｂ．；Ｏｅｌｋｅ，Ｍ．；Ｓｃｈｎｅｃｋ，Ｊ．Ｐ．；ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ Ａｎｔｉｇｅｎ－Ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ Ｃｅｌｌｓ Ａｃｔｉｖａｔｅｓ Ｌｏｗ－Ａｖｉｄｉｔｙ Ｔ Ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０

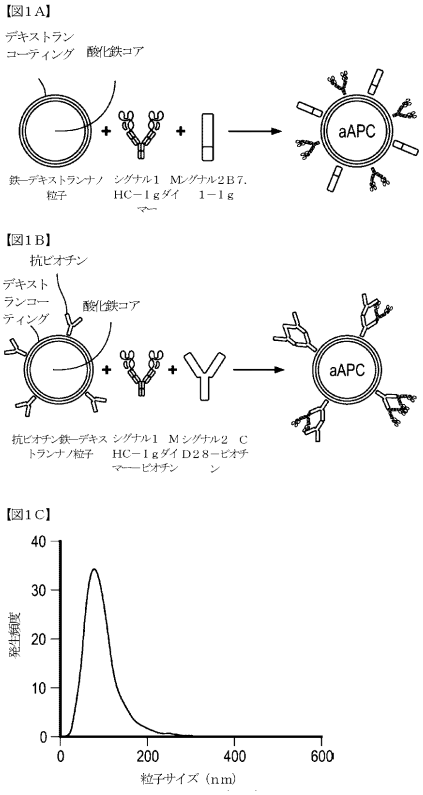
09, 69, 9376-84.
10. Oelke, M. ; Schneck, J. P. Overview of a HLA-Ig Based "Lego-Like System" for T Cell Monitoring, Modulation and Expansion. Immunol. Res. 2010, 47, 248-56.
11. Steenblock, E. ; Wrzesinski, S. ; Flavell, R. ; Fahmy, T. Antigen Presentation on Artificial Acellular Substrates : Modular Systems for Flexible, Adaptable Immunotherapy. Expert Opin. Biol. Ther. 2009, 9 (4) 451-464.
12. Nel, A. E. ; Madler, L. ; Velegol, D. ; Xia, T. ; Hoek, E. M. V ; Somasundaran, P. ; Klaessig, F. ; Castranova, V. ; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. Nat. Mater. 2009, 8, 543-57.
13. Fahmy, T. M. ; Bieler, J. G. ; Edidin, M. ; Schneck, J. P. Increased TCR Avidity after T Cell Activation : a Mechanism for Sensing Low-Density Antigen. Immunity 2001, 14, 135-43.
14. Kumar, R. ; Ferez, M. ; Swamy, M. ; Arechaga, I. ; Rejas, M. T. ; Valpuesta, J. M. ; Schamel, W. W. a ; Alarcon, B. ; Santen, H. M. van Increased Sensitivity of Antigen-Experienced T Cells through the Enrichment of Oligomeric T Cell Receptor Complexes. Immunity 2011, 35, 375-87.
15. Boyle, S. ; Kolin, D. L. ; Bieler, J. G. ; Schneck, J. P. ; Wiseman, P. W. ; Edidin, M. Quantum Dot Fluorescence Characterizes the Nanoscale Organization of T Cell Receptors for Antigen. Biophys. J. 2011, 101, L57-L59.
16. Perica, K. ; Bieler, J. G. ; Edidin, M. ; Schneck, J. Modulation of MHC Binding by Lateral Association of TCR and Coreceptor. Biophys. J. 2012, 103, 1890-8.
17. Lillemeier, B. F. ; Mortelmaier, M. a ; Forstner, M. B. ; Huppa, J. B. ; Groves, J. T. ; Davis, M. M. TCR and Lat Are Expressed on Separate Protein Islands on T Cell Membranes and Concatenate During Activation. Nat. Immunol. 2010, 11, 90-6.
18. Varma, R. ; Campi, G. ; Yokosuka, T. ; Saito, T. ; Dustin, M. L. T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. Immunity 2006, 25, 117-127.
19. Lee, J. -H. ; Kim, E. S. ; Cho, M. H. ; Son, M. ; Yeon, S. -I. ; Shin, J. -S. ; Cheon, J. Artificial C

ontrol of Cell Signaling and Growth by Magnetic Nanoparticles. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2010, 49, 5698−702.
20. Mannix, R. J. ;Kumar, S. ;Cassiola, F. ;Montoya−Zavala, M. ;Feinstein, E. ;Prentiss, M. ;Ingber, D. E. Nanomagnetic Actuation of Receptor−Mediated Signal Transduction. Nat. Nanotechnol. 2008, 3, 36−40.
21. Cho, M. H. ;Lee, E. J. ;Son, M. ;Lee, J. −H. ;Yoo, D. ;Kim, J. −W. ;Park, S. W. ;Shin, J. −S. ;Cheon, J. A Magnetic Switch for the Control of Cell Death Signalling in In Vitro and In Vivo Systems. Nat. Mater. 2012, 11, 1038−1043.
22. Smith−Garvin, J. E. ;Koretzky, G. a ;Jordan, M. S. TCell Activation. Annu. Rev. Immunol. 2009, 27, 591−619.
23. Kunzmann, A. ;Andersson, B. ;Thurnherr, T. ;Krug, H. ;Scheynius, A. ;Fadeel, B. Toxicology of Engineered Nanomaterials:Focus on Biocompatibility, Biodistribution and Biodegradation. Biochim. Biophys. Acta2010, 1810, 361−373.
24. Turtle, C. J. ;Riddell, S. R. Artificial Antigen−Presenting Cells for Use in Adoptive Immunotherapy. 2010, 16.
25. Gunn, J. ;Wallen, H. ;Veiseh, O. ;Sun, C. ;Fang, C. ;Cao, J. ;Yee, C. ;Zhang, M. A Multimodal Targeting Nanoparticle for Selectively Labeling TCells. Small 2008, 4, 712−5.
26. Fahmy, T. M. ;Bieler, J. G. ;Schneck, J. P. Probing TCell Membrane Organization Using Dimeric MHC−Ig Complexes. J. Immunol. Methods2002, 268, 93−106.
27. Dobson, J. Remote Control of Cellular Behaviour with Magnetic Nanoparticles. Nat. Nanotechnol. 2008, 3, 139−43.
28. James, J. R. ;Vale, R. D. Biophysical Mechanism of T−Cell Receptor Triggering In a Reconstituted System. Nature2012, 487, 64−9.
29. Hughes, S. ;Haj, A. J. El ;Dobson, J. Magnetic Micro−and Nanoparticle Mediated Activation of Mechanosensitive Ion Channels. Med. Eng. Phys. 2005, 27, 754−62.
30. Lim, T. S. ;Mortellaro, A. ;Lim, C. T. ;Hammerling, G. J. ;Ricciardi−Castagnoli, P. Mechanical Interactions Between Dendritic Cells and T Cells Correlate with T Cell Responsiveness. J. Immunol. 2011, 187, 258−65.

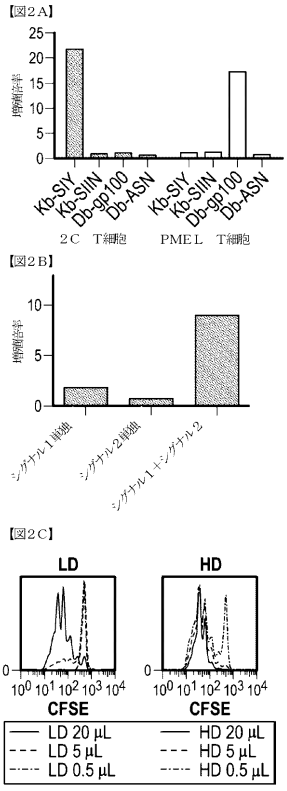
31. Husson, J. ; Chemin, K. ; Bohineust, A. ; Hivroz, C. ; Henry, N. Force Generation Upon TCell Receptor Engagement. PLoS One 2011, 6, e19680.
32. Jenkins, M. K. ; Moon, J. J. The Role of Naive T Cell Precursor Frequency and Recruitment in Dictating Immune Response Magnitude. J. Immunol. 2012, 188, 4135−4140.
33. Blattman, J. N. ; Antia, R. ; Sourdive, D. J. D. ; Wang, X. ; Kaech, S. M. ; Murali−Krishna, K. ; Altman, J. D. ; Ahmed, R. Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen−Specific CD8 TCells. J. Exp. Med. 2002, 195, 657−64.
34. Klebanoff, C. a ; Gattinoni, L. ; Palmer, D. C. ; Muranski, P. ; Ji, Y. ; Hinrichs, C. S. ; Borman, Z. a ; Kerkar, S. P. ; Scott, C. D. ; Finkelstein, S. E. ; et al. Determinants of Successful CD8+T−Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice. Clin. Cancer Res. 2011, 17, 5343−52.
35. Wrzesinski, C. ; Paulos, C. M. ; Kaiser, A. ; Muranski, P. ; Palmer, D. C. ; Gattinoni, L. ; Yu, Z. ; Rosenberg, S. a ; Restifo, N. P. Increased Intensity Lymphodepletion Enhances Tumor Treatment Efficacy of Adoptively Transferred Tumor−Specific TCells. J. Immunother. 2010, 33, 1−7.
36. Restifo, N. P. ; Dudley, M. E. ; Rosenberg, S. a Adoptive Immunotherapy for Cancer:Harnessing the T Cell Response. Nat. Rev. Immunol. 2012, 12, 269−81.
37. Naahidi, S. ; Jafari, M. ; Edalat, F. ; Raymond, K. ; Khademhosseini, A. ; Chen, P. Biocompatibility of Engineered Nanoparticles for Drug Delivery. J. Control. Release2013, 166, 182−94.
38. Grutzkau, A. ; Radbruch, A. Small but Mighty:How the MACS−Technology Based on Nanosized Superparamagnetic Particles Has Helped to Analyze the Immune System Within the Last 20 Years. Cytometry. A2010, 77, 643−7.
39. Dvorak, C. C. ; Gilman, a L. ; Horn, B. ; Oon, C. −Y. ; Dunn, E. a ; Baxter−Lowe, L. a ; Cowan, M. J. Positive Selection and Transplantation of Autologous Highly Purified CD133(+) Stem Cells in Resistant／relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Results in Rapid Hematopoietic Reconstitution Without an Adequate Leukemic Cell Purging. Bone

Marrow Transplant. 2013, 48, 508-13.
40. Cheng, K. ;Malliaras, K. ;Li, T.-S. ;Sun, B. ;Houde, C. ;Galang, G. ;Smith, J. ;Matsushita, N. ;Marban, E. Magnetic Enhancement of Cell Retention, Engraftment, and Functional Benefit after Intracoronary Delivery of Cardiac-Derived Stem Cells in a Rat Model of Ischemia/reperfusion. Cell Transplant. 2012, 21, 1121-35.
41. Kobayashi, T. ;Ochi, M. ;Yanada, S. ;Ishikawa, M. ;Adachi, N. ;Deie, M. ;Arihiro, K. A Novel Cell Delivery System Using Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells and an External Magnetic Device for Clinical Cartilage Repair. Arthroscopy2008, 24, 69-76.
42. Arbab, A. S. ;Jordan, E. K. ;Wilson, L. B. ;Yocum, G. T. ;Lewis, B. K. ;Frank, J. a In Vivo Trafficking and Targeted Delivery of Magnetically Labeled Stem Cells. Hum. Gene Ther. 2004, 15, 351-60.
43. Hinrichs, C. S. ;Borman, Z. a;Gattinoni, L. ;Yu, Z. ;Burns, W. R. ;Huang, J. ;Klebanoff, C. a ;Johnson, L. a;Kerkar, S. P. ;Yang, S. ;et al. Human Effector CD8+TCells Derived from Naive Rather Than Memory Subsets Possess Superior Traits for Adoptive Immunotherapy. Blood2011, 117, 808-14.
44. Hinrichs, C. S. ;Borman, Z. a;Cassard, L. ;Gattinoni, L. ;Spolski, R. ;Yu, Z. ;Sanchez-Perez, L. ;Muranski, P. ;Kern, S. J. ;Logun, C. ;et al. Adoptively Transferred Effector Cells Derived from Naive Rather Than Central Memory CD8+ T Cells Mediate Superior Antitumor Immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106, 17469-74.
45. Klebanoff, C. a;Gattinoni, L. ;Restifo, N. P. Sorting through Subsets:Which T-Cell Populations Mediate Highly Effective Adoptive Immunotherapy? J. Immunother. 2012, 35, 651-60.
46. Durai, M. ;Krueger, C. ;Ye, Z. ;Cheng, L. ;Mackensen, A. ;Oelke, M. ;Schneck, J. P. In Vivo Functional Efficacy of Tumor-Specific T Cells Expanded Using HLA-Ig Based Artificial Antigen Presenting Cells(aAPC). Cancer Immunol. Immunother. 2009, 58, 209-20.

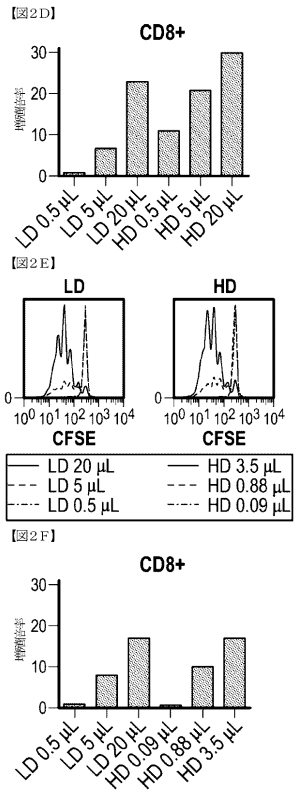
【図１】



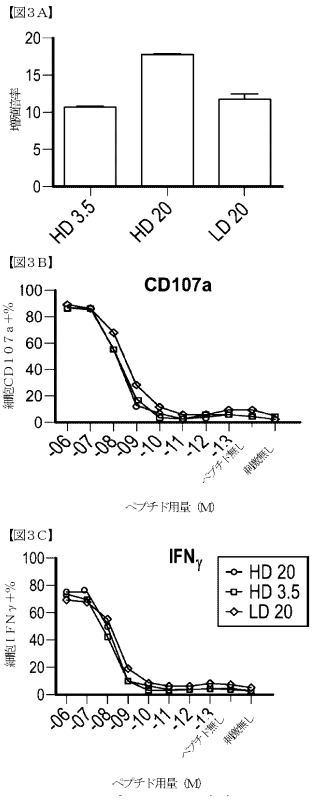

【図２－１】



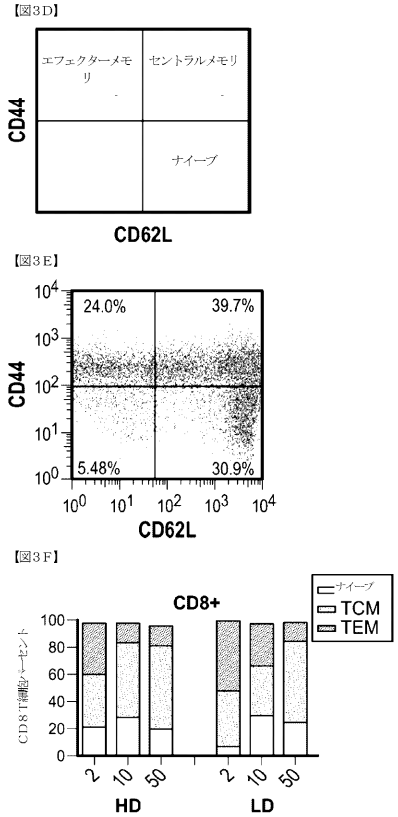

【図２－２】



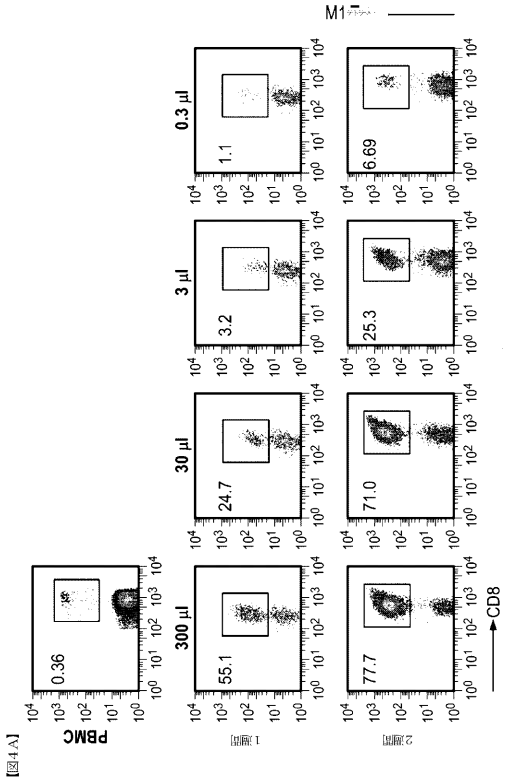

【図３－１】



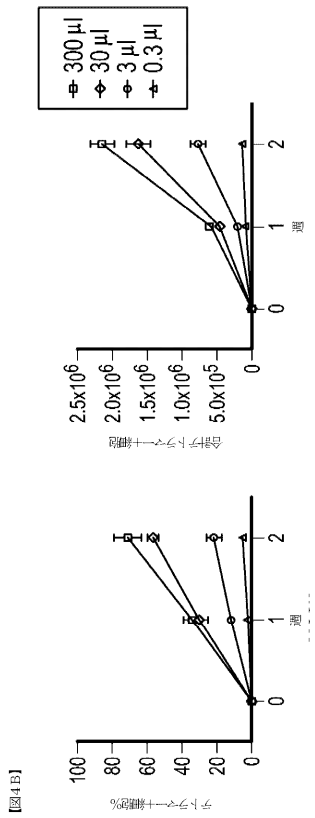
【図３－２】



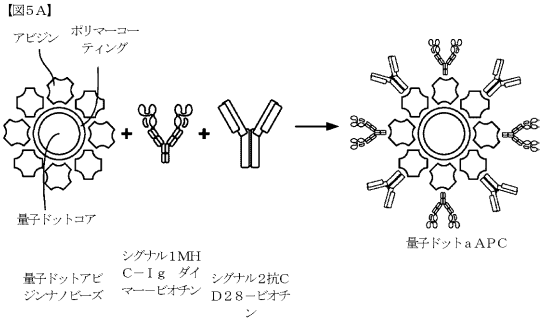

【図４Ａ】

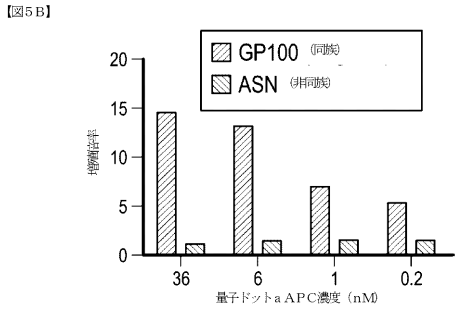



【図４Ｂ】

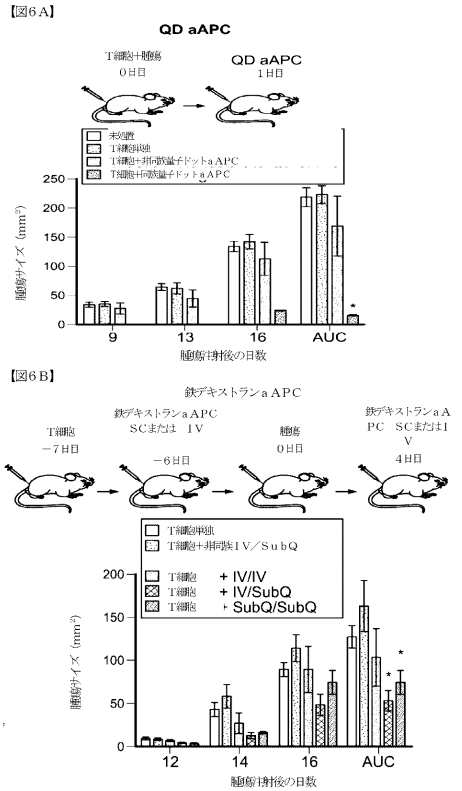



【図５】

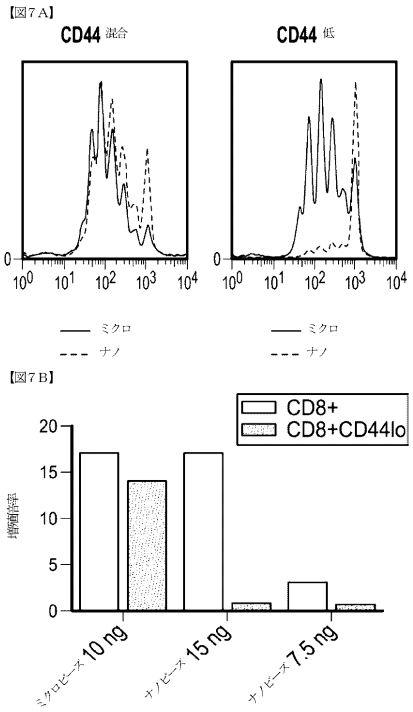


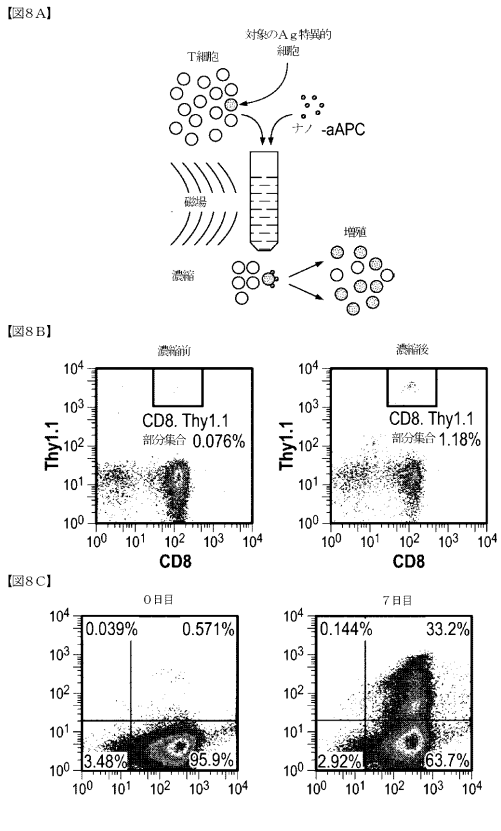
【図６】


【図6A】
QD aAPC
T細胞+腫瘍
0日目
QD aAPC
1日目
未処置
T細胞単独
T細胞+非ドット数量子ドットaAPC
T細胞+ドット数量子ドットaAPC
腫瘍サイズ（mm²）
腫瘍注射後の日数
【図6B】
鉄デキストランaAPC
T細胞
−7日目
鉄デキストランaAPC
SCまたは IV
−6日目
腫瘍
0日目
鉄デキストランaAPC SCまたはIV
4日目
T細胞単独
T細胞+非同族IV／SubQ
T細胞 + IV/IV
T細胞 + IV/SubQ
T細胞 + SubQ/SubQ
腫瘍サイズ（mm²）
腫瘍注射後の日数

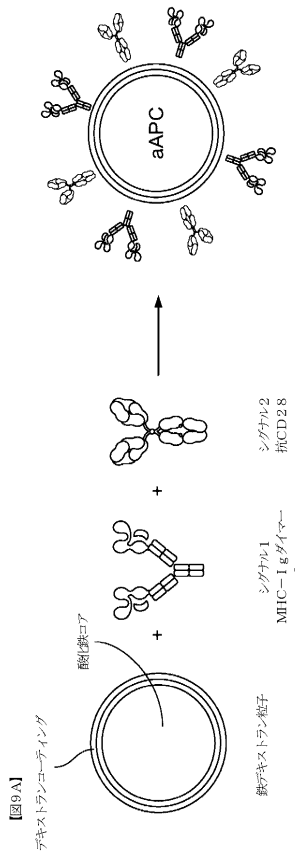
【図７】


【図7A】
CD44 混合
CD44 低
ミクロ
ナノ
【図7B】
CD8+
CD8+CD44lo
増殖倍率
ミクロビーズ 10 ng
ナノビーズ 15 ng
ナノビーズ 7.5 ng

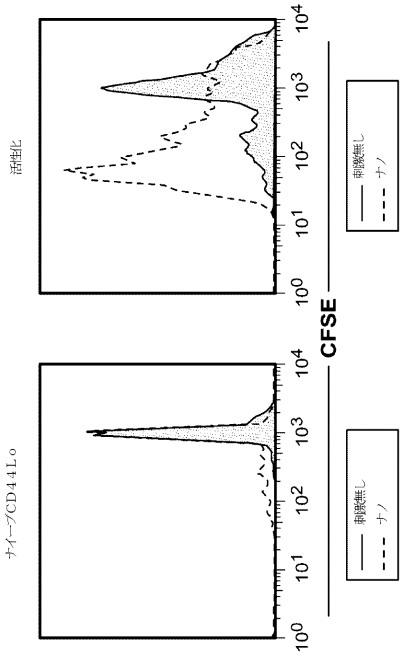
【図８－１】


【図8A】
対象のAg特異的細胞
T細胞
ナノ -aAPC
磁場
増殖
濃縮
【図8B】
濃縮前
濃縮後
CD8. Thy1.1
部分集合 0.076%
部分集合 1.18%
Thy1.1
CD8
【図8C】
0日目
7日目
0.039%
0.571%
3.48%
95.9%
0.144%
33.2%
2.92%
63.7%

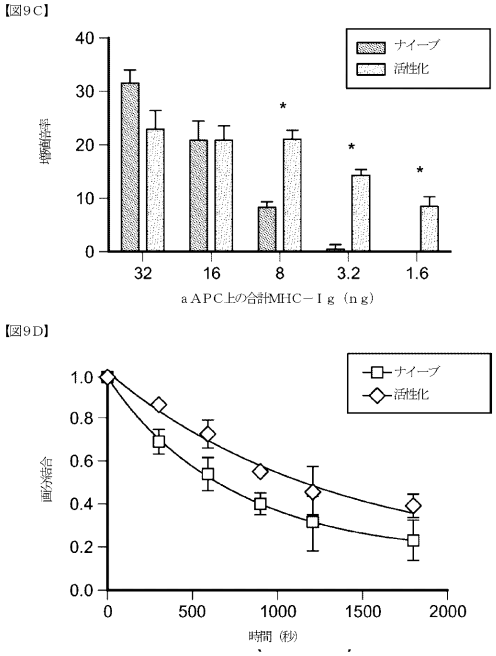
【図９－１】


【図9A】
aAPC
デキストランコーティング
酸化鉄コア
鉄デキストラン粒子
シグナル1
MHC−Igダイマー
シグナル2
抗CD28

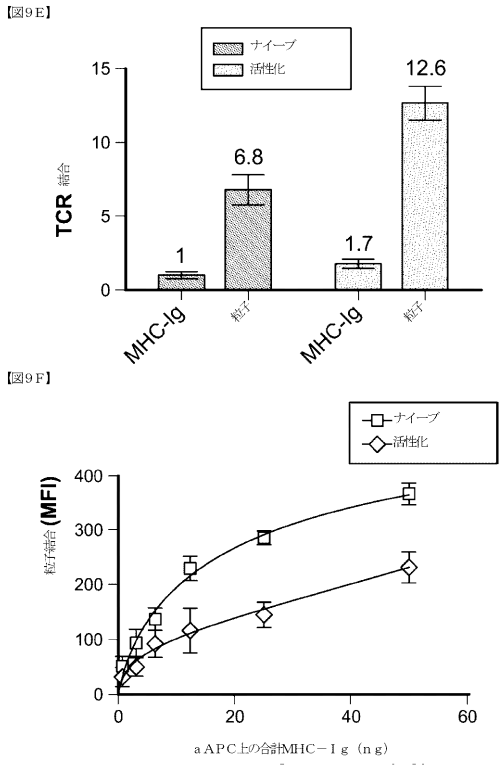
【図９－２】



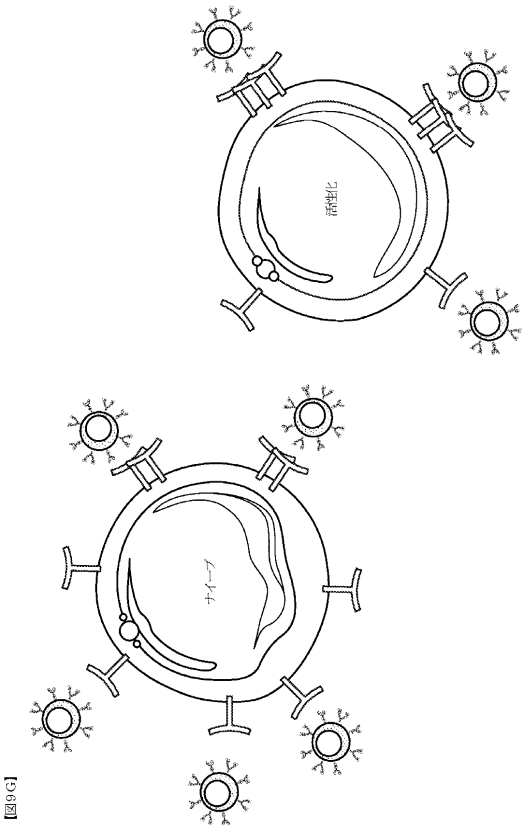

【図９－３】



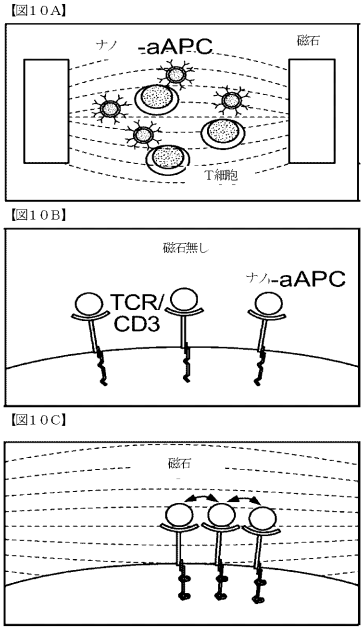

【図９－４】



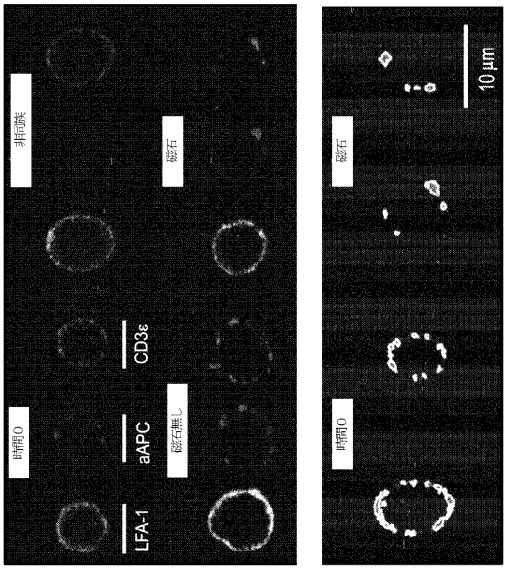

【図９－５】



【図１０－１】

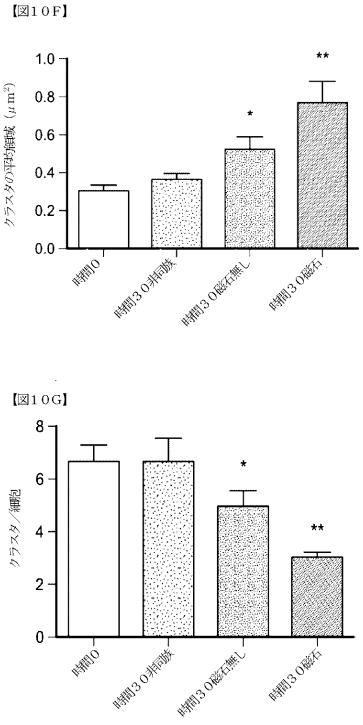



【図１０－２】

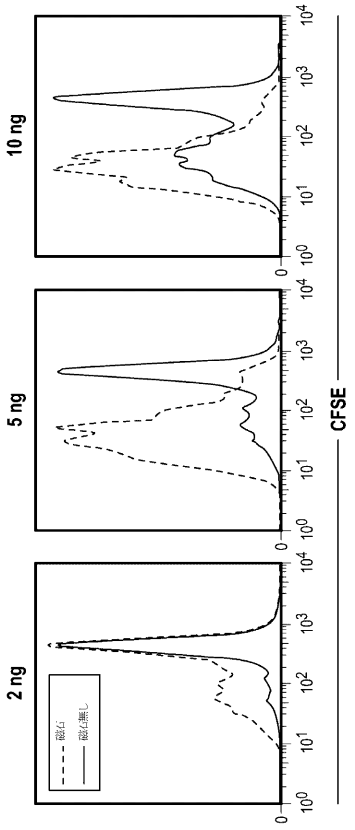



【図10D】 【図10E】

【図１０－３】

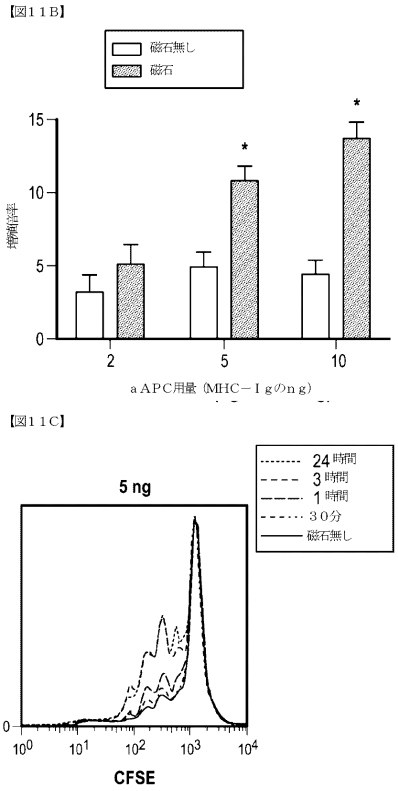



【図１１－１】

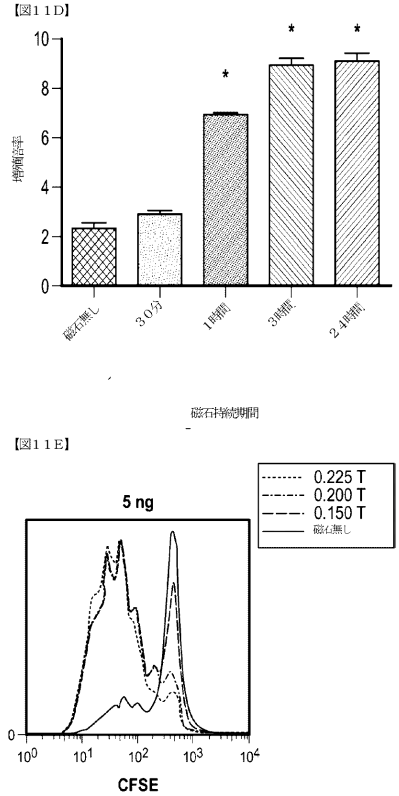



【図11A】

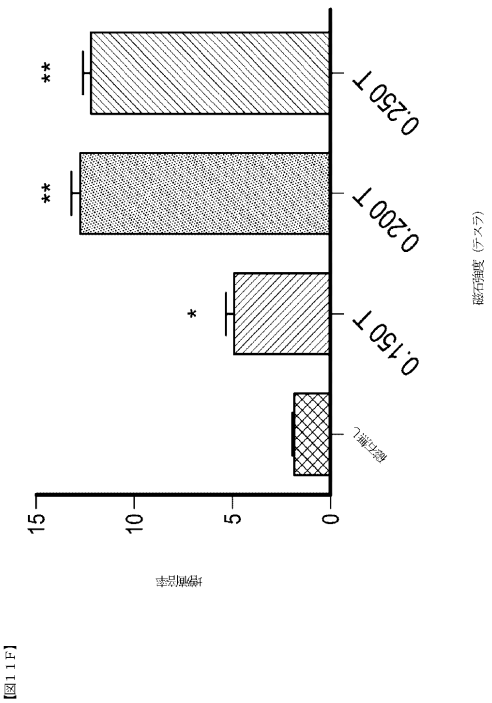
【図１１－２】




【図１１－３】

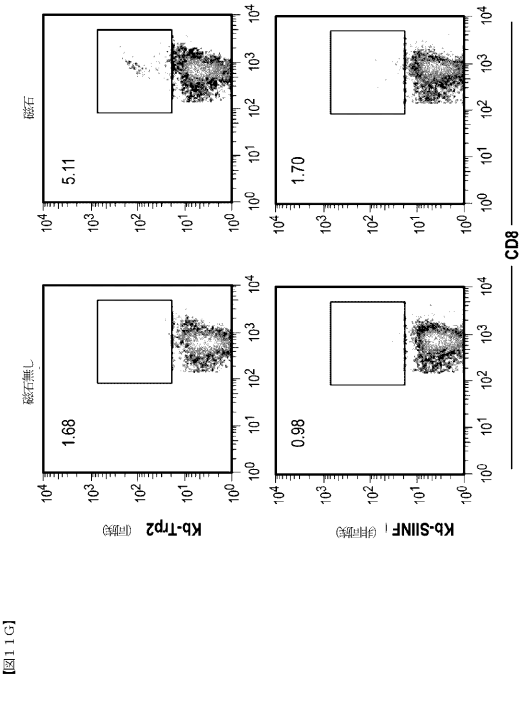



【図１１－４】



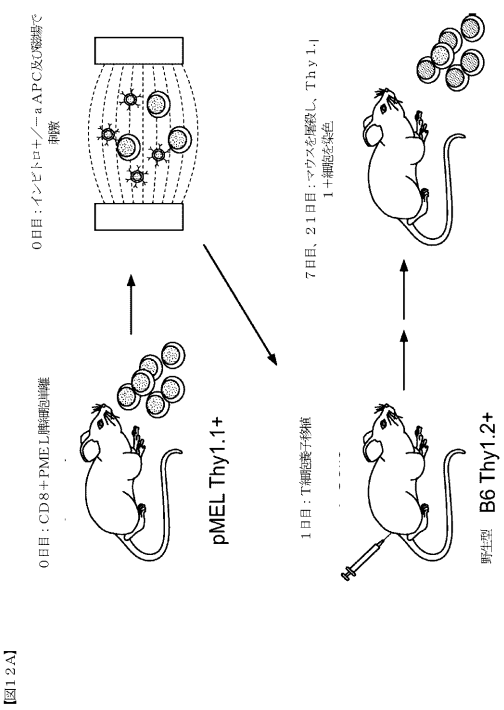

【図11F】

【図１１－５】

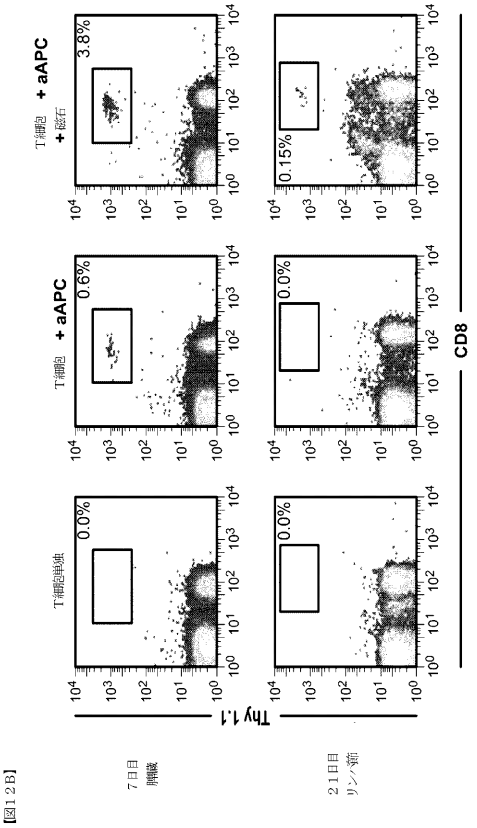



【図11G】

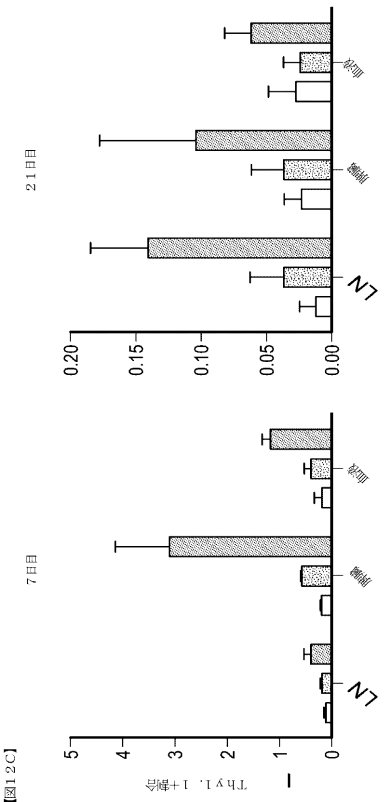
【図１２Ａ】



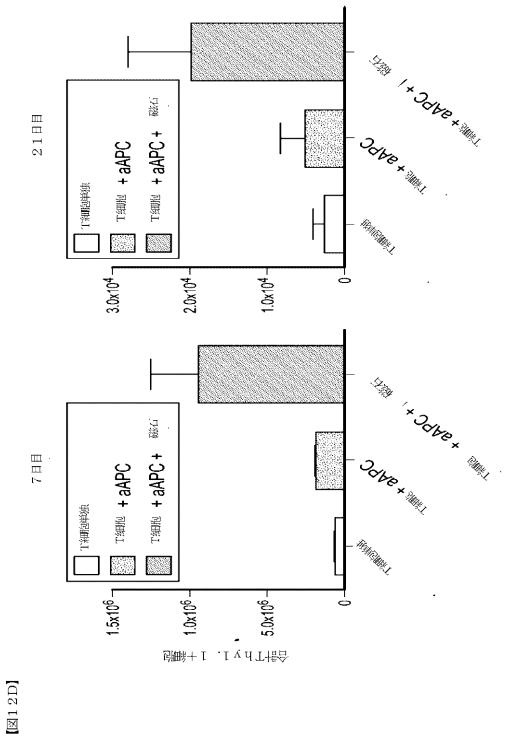

【図１２Ｂ】



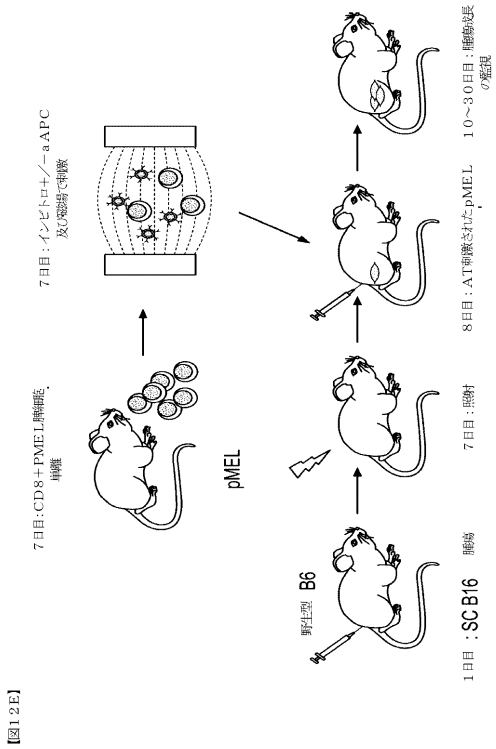

【図１２Ｃ】



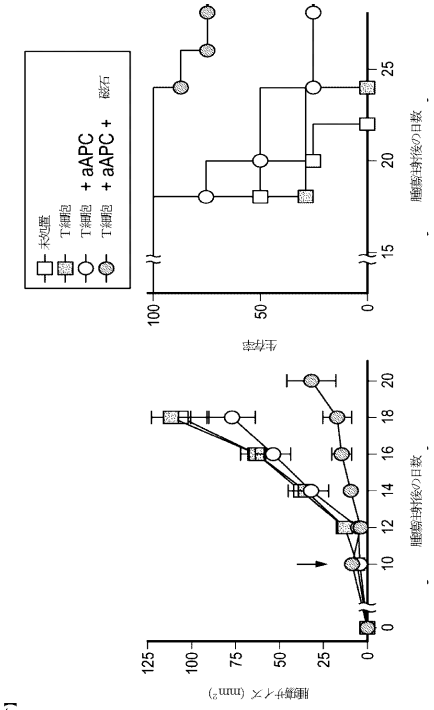

【図１２Ｄ】



【図１２Ｅ】

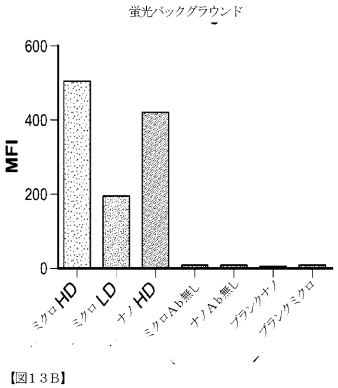



【図１２Ｆ】

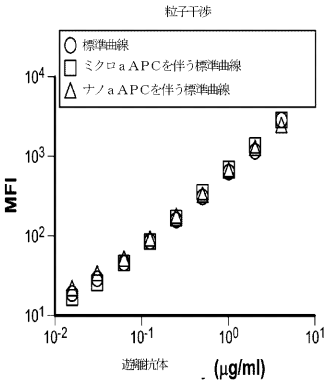



【図１３－１】

【図13A】

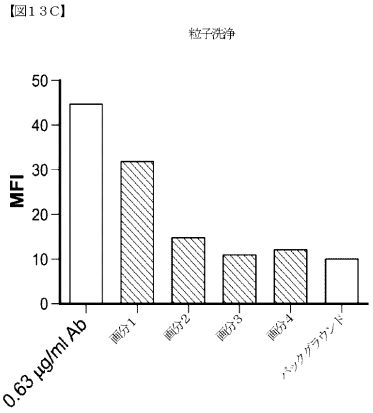



【図13B】

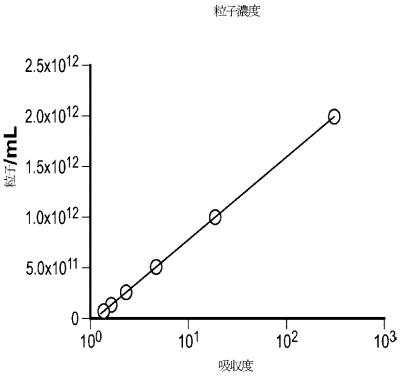



【図１３－２】

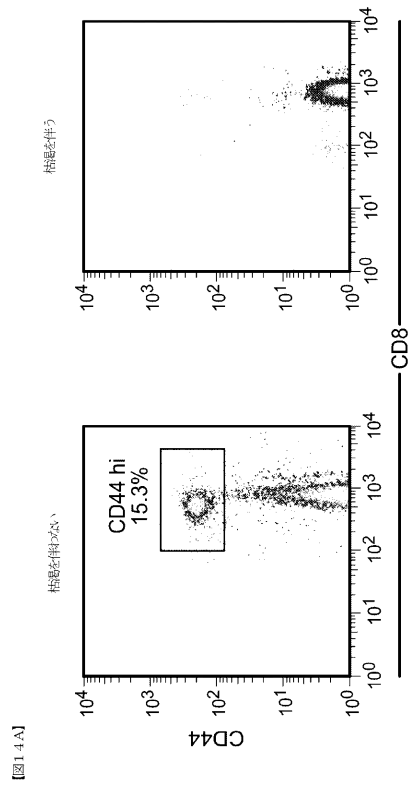
【図13C】



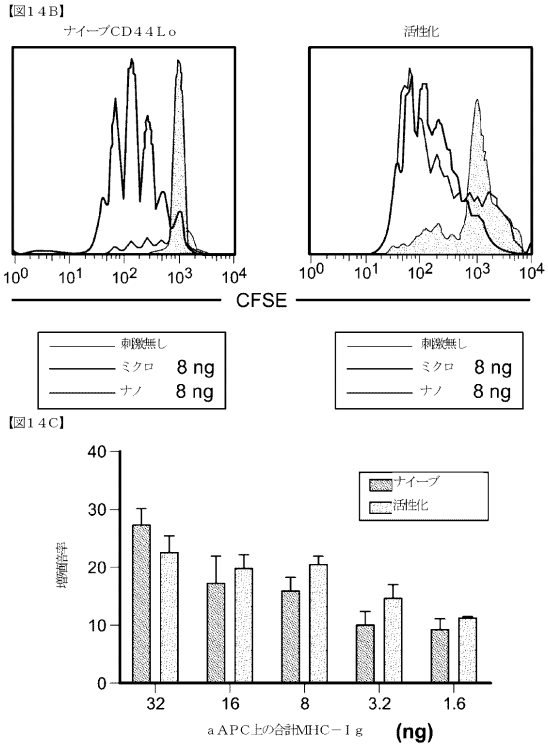

【図13D】



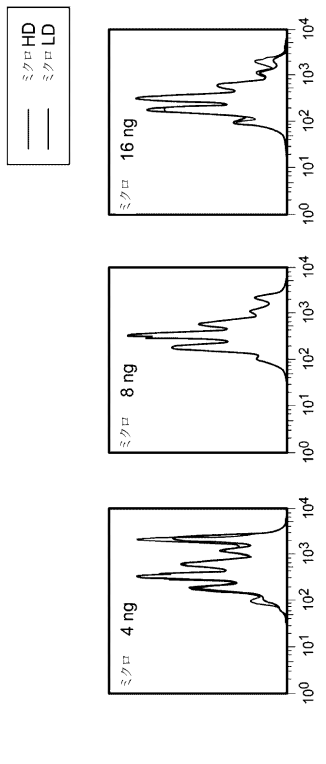
【図１４－１】



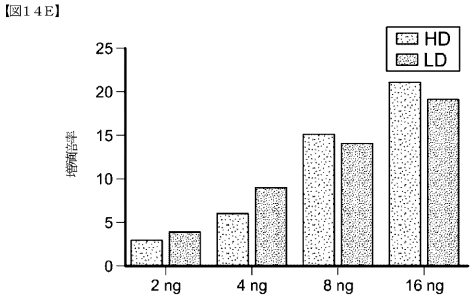

【図１４－２】



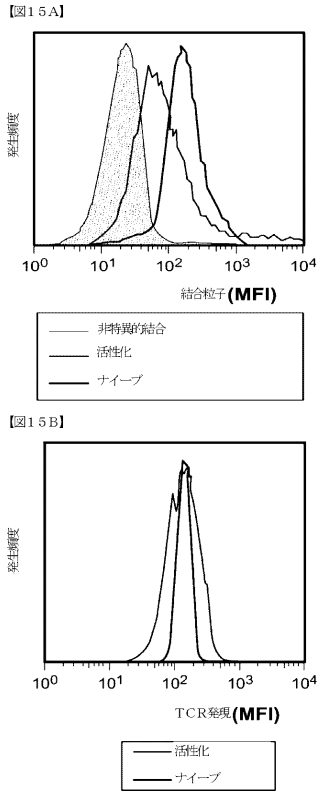

【図１４－３】



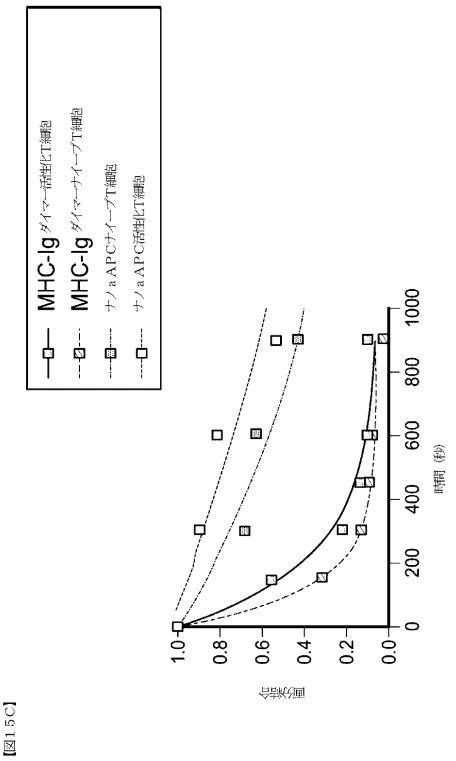

【図１４－４】



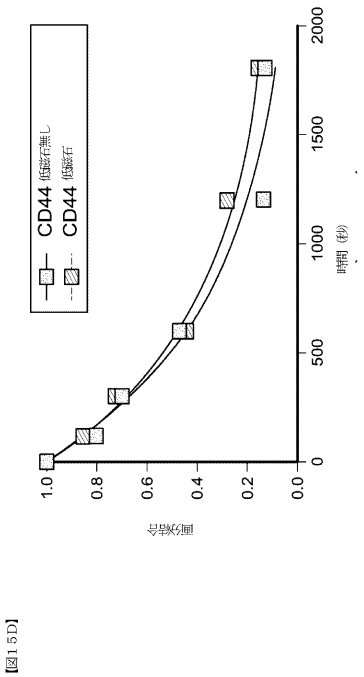
【図１５－１】



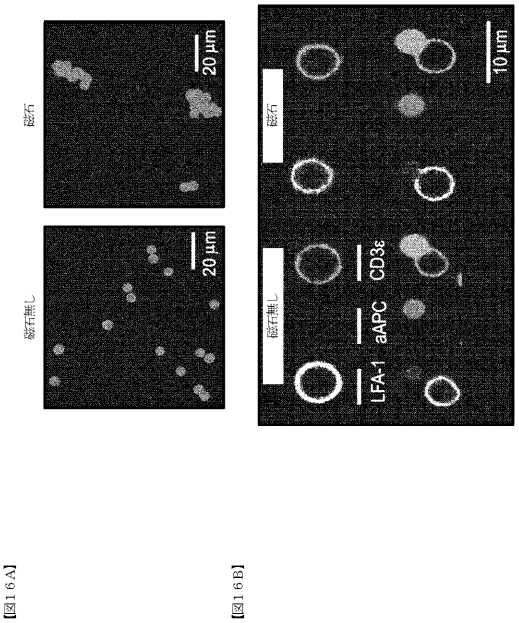

【図１５－２】



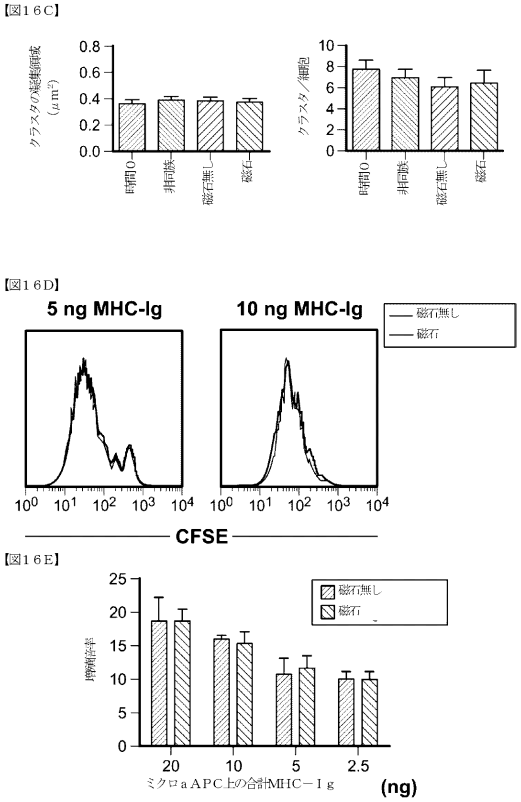

【図１５－３】



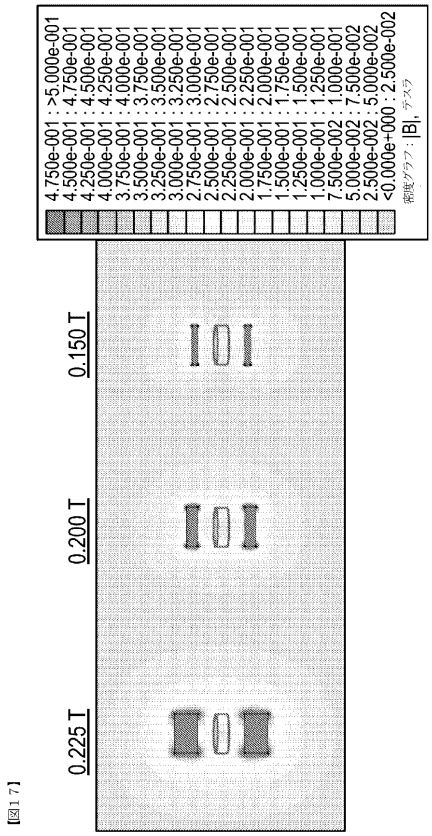

【図１６－１】



【図１６－２】

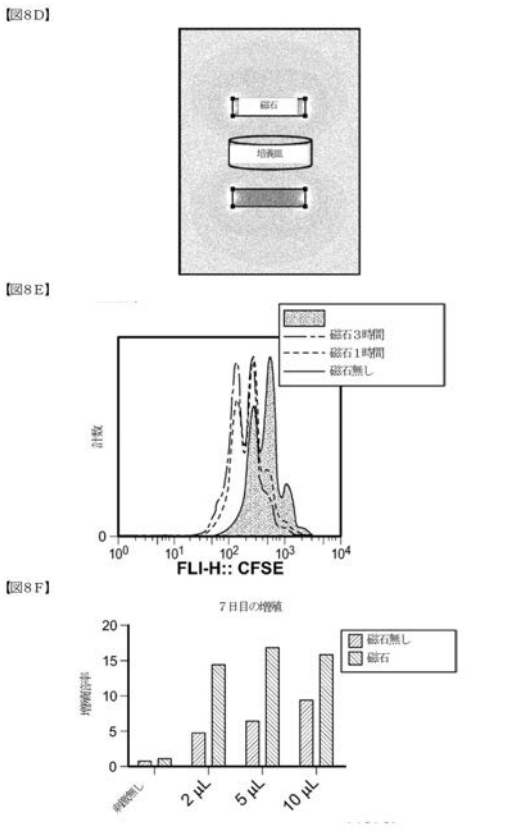



【図１７】




【図１７】

【図８－２】



【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/US2014/025889**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**C12N 5/078(2010.01)i, A61K 35/12(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N 5/078; C12P 21/08; C07K 16/100; A61K 35/12; C07K 16/00; A61K 38/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: artifical antigen presenting cell(aAPC), nanoparticle, lymphocyte, T cell, B cell, MHC, antigen presenting complex

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | US 2010-0284965 A1 (FAHMY, T. et al.) 11 November 2010<br>See paragraphs [0015], [0023], [0068]-[0071], [0101]-[0107], [0148]-[0150], [0250] and [0263]; claims 19-20 and 25-43. | 1-7,44-45,72-73,75-77,81-83 |
| Y | | 46-49 |
| Y | US 6015884 A (SCHNECK, J. et al.) 18 January 2000<br>See abstract; claims 1-10; figures 1B-1D. | 46-47 |
| Y | US 6268411 B1 (SCHNECK, J. et al.) 31 July 2001<br>See abstract; claims 1-11; figures 1A and 3. | 48-49 |
| PX | PERICA, K. et al., `Nanoscale artificial antigen presenting cells for T cell immunotherapy`, Nanomedicine, 24 July 2013, Vol. 10, No. 1, pp. 119-129.<br>See the whole document. | 1-7,44-49,72-73,75-77,81-83 |
| A | CHIU, Y. L. et al., `HLA-Ig based artificial antigen presenting cells for efficient ex vivo expansion of human CTL`, Journal of Visualized Experiments, 11 April 2011, Vol. 50, pp. 1-4.<br>See abstract; pages 1-2. | 1-7,44-49,72-73,75-77,81-83 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 21 July 2014 (21.07.2014) | **22 July 2014 (22.07.2014)** |

Name and mailing address of the ISA/KR
International Application Division
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-472-7140

Authorized officer
HEO, Joo Hyung
Telephone No. +82-42-481-8150

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/US2014/025889**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 63-71, 78-80, 85
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 63-71, 78-80 and 85 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, underPCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☒ Claims Nos.: 9-11, 13-43, 51-56, 58-68, 86-87
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9-11, 13-43, 51-56, 58-68 and 86-87 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 8, 12, 50, 57, 74, 84-85
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
**PCT/US2014/025889**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| US 2010-0284965 A1 | 11/11/2010 | US 8629098 B2 | 14/01/2014 |
| | | WO 2009-094273 A2 | 30/07/2009 |
| | | WO 2009-094273 A3 | 14/01/2010 |
| US 06015884 A | 18/01/2000 | AU 1997-24224 B2 | 01/02/2001 |
| | | EP 1076619 A1 | 21/02/2001 |
| | | EP 1076619 B1 | 09/10/2002 |
| | | JP 11-507843 A | 13/07/1999 |
| | | JP 2002-513710 A | 14/05/2002 |
| | | KR 10-0544449 B1 | 31/10/2006 |
| | | US 2002-0006903 A1 | 17/01/2002 |
| | | US 2002-0127231 A1 | 12/09/2002 |
| | | US 2004-0204565 A1 | 14/10/2004 |
| | | US 6082792 A | 04/07/2000 |
| | | US 6140113 A | 31/10/2000 |
| | | US 6268411 B1 | 31/07/2001 |
| | | US 6448071 B1 | 10/09/2002 |
| | | US 6458354 B1 | 01/10/2002 |
| | | US 6734013 B2 | 11/05/2004 |
| | | US 7973137 B1 | 05/07/2011 |
| | | WO 97-35991 A1 | 02/10/1997 |
| | | WO 99-56990 A1 | 11/11/1999 |
| US 6268411 B1 | 31/07/2001 | AT 377086 T | 15/11/2007 |
| | | AU 1997-24224 B2 | 01/02/2001 |
| | | AU 9477698 A | 29/03/1999 |
| | | CA 2303396 A1 | 18/03/1999 |
| | | DE 69838648 D1 | 13/12/2007 |
| | | DE 69838648 T2 | 28/08/2008 |
| | | EP 1012320 A2 | 28/06/2000 |
| | | EP 1012320 B1 | 31/10/2007 |
| | | EP 1076619 A1 | 21/02/2001 |
| | | EP 1076619 B1 | 09/10/2002 |
| | | JP 11-507843 A | 13/07/1999 |
| | | JP 2001-515726 A | 25/09/2001 |
| | | JP 2002-513710 A | 14/05/2002 |
| | | KR 10-0544449 B1 | 31/10/2006 |
| | | US 2002-0006903 A1 | 17/01/2002 |
| | | US 2002-0127231 A1 | 12/09/2002 |
| | | US 2004-0204565 A1 | 14/10/2004 |
| | | US 6015884 A | 18/01/2000 |
| | | US 6082792 A | 04/07/2000 |
| | | US 6140113 A | 31/10/2000 |
| | | US 6448071 B1 | 10/09/2002 |
| | | US 6458354 B1 | 01/10/2002 |
| | | US 6734013 B2 | 11/05/2004 |
| | | US 7973137 B1 | 05/07/2011 |
| | | WO 97-35991 A1 | 02/10/1997 |
| | | WO 99-13095 A2 | 18/03/1999 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
**PCT/US2014/025889**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| | | WO 99-13095 A3 | 10/06/1999 |
| | | WO 99-13095 A9 | 15/07/1999 |
| | | WO 99-56990 A1 | 11/11/1999 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *A61K 45/00* | *(2006.01)* | A61K | 45/00 | | 4H045 |
| *A61K 9/16* | *(2006.01)* | A61K | 9/16 | | |
| *A61K 38/00* | *(2006.01)* | A61K | 37/02 | | |
| *A61K 38/04* | *(2006.01)* | A61K | 37/43 | | |
| *A61K 39/00* | *(2006.01)* | A61K | 39/00 | H | |
| *A61K 39/395* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | Y | |
| *A61P 43/00* | *(2006.01)* | A61P | 43/00 | 121 | |
| *A61P 35/00* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | | |
| *A61P 37/02* | *(2006.01)* | A61P | 37/02 | | |
| *A61P 31/00* | *(2006.01)* | A61P | 31/00 | | |
| *A61K 45/06* | *(2006.01)* | A61K | 45/06 | | |
| *A61P 37/04* | *(2006.01)* | A61P | 37/04 | | |
| *A61P 37/06* | *(2006.01)* | A61P | 37/06 | | |
| *C07K 14/74* | *(2006.01)* | C07K | 14/74 | | |
| *C07K 14/52* | *(2006.01)* | C07K | 14/52 | | |
| *C07K 14/725* | *(2006.01)* | C07K | 14/725 | | |
| *C12N 5/0783* | *(2010.01)* | C12N | 5/0783 | | |

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

(72)発明者 エールケ, マチアス
アメリカ合衆国 メリーランド ２１２３４, ボルチモア, ウィルソン アベニュー ７８１２
(72)発明者 ペリカ, カルロ
アメリカ合衆国 メリーランド ２１２０１, ボルチモア, エヌ チャールズ １２０９ ナンバー２２１

Ｆターム(参考) 4B065 AA94X AC20 BA30 CA44
4C076 AA30 CC06 CC07 CC27 CC31 CC41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 DA01 MA55 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB071 ZB081 ZB091 ZB261 ZB311 ZC752
4C085 AA03 AA33 EE03 GG01 GG02 GG04 GG05
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA32 MA55 MA66 NA14 ZB07 ZB08 ZB09 ZB26 ZB31 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA40 BA41 BA62 BA63 CA40 DA50 DA76 EA28