(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2022-1069
(P2022-1069A)
(43)公開日　令和4年1月6日(2022.1.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/0783	ZNA	4B029
A61K 35/17	(2015.01)	A61K	35/17	Z	4B065
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C087
A61P 35/02	(2006.01)	A61P	35/02		4H045
A61P 37/02	(2006.01)	A61P	37/02		

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 148 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-168585 (P2021-168585)
(22)出願日　令和3年10月14日 (2021.10.14)
(62)分割の表示　特願2019-501623 (P2019-501623)の分割
原出願日　平成29年7月13日 (2017.7.13)
(31)優先権主張番号　62/361,891
(32)優先日　平成28年7月13日 (2016.7.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　507044516
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３８，　ケンブリッジ，　クインシー　ストリート　１７
(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　アレクサンダー　シン　チュン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，　ビニー　ストリート　１９５，　ナンバー４３０５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗原提示細胞模倣足場およびそれを作製および使用するための方法

(57)【要約】
【課題】ヒトの疾患（例えば、免疫不全障害、自己免疫障害、およびがん）の治療に容易に利用され得る、Ｔ細胞の単離を可能にする組成物および方法を提供する。
【解決手段】本発明は、Ｔ細胞を操作する、例えば、活性化する、刺激する、拡大する、増殖させる、または賦活する（ｅｎｅｒｇｉｚｉｎｇ）ための組成物および方法を提供する。この状況では、本発明の実施形態は、ある種のマーカーおよび／もしくは細胞表面レセプターを発現するか、またはＴ細胞媒介性免疫応答に最適なある種のサイトカインを生成する多数の（または実質的に純粋な部分集団の）活性化Ｔ細胞を生成するための方法を提供する。このような操作されたＴ細胞は、多くの疾患（例えば、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、アレルギー、加齢に関連得る免疫機能不全、または処置にＴ細胞が望まれる任意の他の疾患状態）の処置および防止において使用され得る。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１６年７月１３日に出願された米国仮特許出願番号第６２／３６１，８９１号に基づく優先権を主張しており、その全体の内容は、参考として明示して本明細書中に援用される。
【０００２】
政府支援の陳述
本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された認可番号ＥＢ０１５４９８、ＥＢ０１４７０３およびＤＥ０１３０３３の下、政府支援でなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
Ｔリンパ球（Ｔ細胞）のプライミングおよび拡大を含む免疫療法は、がんおよび感染性疾患の処置のために、特に、ヒトにおいて有望である（Ｍｅｌｉｅｆら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．１４５：１６７－１７７（１９９５）；Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：５４５－５８６（１９９５））。ウイルス感染および／またはがんを有する患者における養子移入の現在の研究は、自家樹状細胞（ＤＣ）、ウイルス感染したＢ細胞、および／または同種異系フィーダー細胞上で何週間もの間インビトロで刺激し、クローン化し、そして拡大したＴ細胞の注入を含む（Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｓｃｉｅｎｃｅ２５７：２３８－２４１（１９９２）；Ｙｅｅら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１６３７－１６４４（２０００），Ｂｒｏｄｉｅら，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．５：３４－４１（１９９９）；Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：３１９－３３８（１９９２），Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２８：１８９－２０１（１９９０））。しかし、養子Ｔ細胞免疫療法の臨床試験はしばしば、数十億個の細胞を要する（Ｒｉｄｄｅｌｌら，１９９５）ことから、既存のインビトロＴ細胞拡大プロトコルはしばしば、このような治験の要求を満たすには不十分である。
【０００４】
さらに、最適な生着は、再注入の時点で、機能的であり、かつ老化していないＴ細胞の使用を要する。臨床適用のために、Ｔ細胞が所望の機能性を有する、すなわち、それらが増殖し、エフェクター機能を発揮し、所望の様式でサイトカインを生成することを担保することが重要である（Ｌｉｅｂｏｗｉｔｚら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１０，５３３－５４１，１９９８）。天然の状況において、Ｔ細胞活性化は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に結合したペプチド抗原による、Ｔ細胞レセプター／ＣＤ３複合体（ＴＣＲ／ＣＤ３）のエンゲージメントによって開始される（Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８：１３４９（１９９０））。これは、Ｔ細胞活性化における一次シグナルである一方で、ＡＰＣとＴ細胞との間の他のレセプターーリガンド相互作用も、完全な活性化に必要とされる。例えば、他の分子相互作用の非存在下でのＴＣＲ刺激は、これらの細胞が再刺激の際に完全な活性化シグナルに応答できないように、アネルギーの状態を誘導し得る（Ｓｃｈｗａｒｔｚ，１９９０；Ｈａｒｄｉｎｇ，ら，Ｎａｔｕｒｅ ３５６：６０７，１９９２；Ｄｕｄｌｅｙら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．，１６，６１２２－６１３１，２０１０；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．，１７，４５５０－４５５７，２０１

１）。代わりに、Ｔ細胞は、ＴＣＲエンゲージメント単独によって活性化される場合に、プログラムされた細胞死（アポトーシス）によって死滅し得る（Ｗｅｂｂら，Ｃｅｌｌ ６３：１２４９，１９９０；Ｋａｗａｂｅら，Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２４５，１９９１；Ｋａｂｅｌｉｔｚら，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：１３８１，１９９２；Ｇｒｏｕｘら，Ｅｕｒ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：１６２３，１９９３）。

【０００５】

よって、最適な機能性は、第２のシグナル伝達分子、例えば、膜結合タンパク質またはＡＰＣの分泌生成物の使用を介して付与され得る。膜結合タンパク質の状況では、このような第２の相互作用は通常、本質的に接着性であり、その２種の細胞の間の接触を強化する（Ｓｐｒｉｎｇｅｒら，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５：２２３，１９８７）。他のシグナル伝達分子（例えば、ＡＰＣからＴ細胞へのさらなる活性化シグナルの伝達）がまた、関連し得る（Ｂｉｅｒｅｒら，Ａｄｖ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：４９，１９９１））。例えば、ＣＤ２８は、ヒトにおいて末梢Ｔ細胞のうちの８０％に存在する表面糖タンパク質であり、静止Ｔ細胞および活性化Ｔ細胞の両方に存在する。ＣＤ２８は、Ｂ７－１（ＣＤ８０）またはＢ７－２（ＣＤ８６）に結合し、公知の共刺激分子の中で最も強力なもののうちの１つである（Ｊｕｎｅら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １５：３２１（１９９４），Ｌｉｎｓｌｅｙら，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１：１９１（１９９３））。ＴＣＲエンゲージメントと合同してＴ細胞上のＣＤ２８連結は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）の生成を誘導する（Ｊｕｎｅら，１９９４；Ｊｅｎｋｉｎｓら，１９９３；Ｓｃｈｗａｒｔｚ，１９９２）。分泌されたＩＬ－２は、エキソビボＴ細胞拡大にとっての重要な因子である（Ｓｍｉｔｈら，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３３２：４２３－４３２（１９７９）；Ｇｉｌｌｉｓら，Ｎａｔｕｒｅ ２６８：１５４－１５６（１９７７））。

【０００６】

Ｔ細胞の共刺激は、Ｔ細胞活性化の複数の局面に影響を及ぼすことが示された（Ｊｕｎｅら，１９９４）。それは、培養において増殖応答を誘導するために必要な抗ＣＤ３の濃度を低下させる（Ｇｉｍｍｉら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：６５７５（１９９１））。ＣＤ２８共刺激はまた、遺伝子発現の転写調節および転写後調節を通じて、ヘルパーＴ細胞によるリンホカインの生成を顕著に増強し（Ｌｉｎｄｓｔｅｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：３３９（１９８９）；Ｆｒａｓｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：３１３（１９９１））、細胞傷害性Ｔ細胞の細胞融解潜在能力を活性化し得る。インビボでのＣＤ２８共刺激の阻害は、異種移植片拒絶を遮断し得、そして同種異系移植片拒絶は、かなり遅れる（Ｌｅｎｓｃｈｏｗら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：７８９（１９９２）；Ｔｕｒｋａら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１１１０２（１９９２））。

【０００７】

より重要なことには、刺激性／共刺激性の刺激に関する前述のエフェクターは、インビトロでのＴ細胞の操作の状況において広く適用されてきた。この状況では、抗ＣＤ３モノクローナル抗体（第１のシグナル）および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体（第２のシグナル）の組み合わせは、ＡＰＣを刺激するために最も一般的に使用される。抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体によって提供されるシグナルは、その抗体が固体表面（例えば、プラスチックプレート（Ｂａｒｏｊａら，Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１２０，２０５－２１７，１９８９；Ｄａｍｌｅら，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１４３，１７６１－１７６７，１９８９））またはセファロースビーズ（Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１１５，２４６－２５６，１９８８））上に固定化される場合、Ｔ細胞に最もよく送達される。Ｊｕｎｅらに発行された米国特許第６，３５２，６９４号もまた参照のこと。

【０００８】
種々の表面、ならびに抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体を含む試薬が、種々の適用のためにＴ細胞を得て拡大するために開発されてきた。例えば、Ｌｅｖｉｎｅら（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１５９，Ｎｏ．１２：ｐｐ．５９２１－５９３０，１９９７）は、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体を含む４．５ミクロン（μＭ）直径を有するトシル－活性化常磁性ビーズを開示し、これらは、Ｔ細胞を刺激および増殖し、それらを誘導して、炎症促進性サイトカインを生成するために利用され得る。これらビーズで活性化されたＴ細胞が、サイトカイン生成のような、それらＴ細胞を養子免疫療法に潜在的に有用にする特性を示すことがまた、示された（Ｇａｒｌｉｅら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２２（４）：３３６－４５，１９９９；Ｓｈｉｂｕｙａら，Ａｒｃｈ Ｏｔｏｌａｒｙｎｇｏｌ Ｈｅａｄ Ｎｅｃｋ Ｓｕｒｇ，ｖｏｌ．１２６，Ｎｏ．４：４７３－４７９，２０００）。これらビーズは、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．から商品名ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ ＣＤ３／ＣＤ２８ Ｔ－ｃｅｌｌ ｅｘｐａｎｓｉｏｎの下で市販されている。

【０００９】
細胞療法におけるＴ細胞の拡大のための固定化されたモノクローナル抗体を有する常磁性ビーズの使用は、患者に注入する前に、Ｔ細胞からビーズを分離および除去することを要する。これは、非常に労働集約的なプロセスであり、細胞喪失、細胞損傷、夾雑するリスクの増大および処理コストの増大を生じる。そのビーズ上の固定化されたモノクローナル抗体と、標的Ｔ細胞の表面上の対応リガンドとの強固な会合が原因で、そのビーズをＴ細胞から除去することは困難である。そのビーズ－細胞結合体はしばしば、Ｔ細胞がその標的抗原を内部移行するまで待ち、次いで、機械的破壊技術を使用して、そのビーズをＴ細胞から分離することによって、分離される。この技術は、Ｔ細胞に損傷を引き起こし得、そしてまた、そのＴ細胞上の連結した抗原をその細胞表面から除去させ得る（Ｒｕｂｂｉら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６６，２３３－２４１，１９９３）。さらに、活性化Ｔ細胞はしばしば、細胞療法プロトコルにおける使用に最も望ましく、そしてその細胞の望ましい特性は２４～７２時間の待ち時間の間に失われることから、常磁性分離は、養子細胞療法の状況では使用が制限されていた。

常磁性ビーズに付着した細胞を分離および精製するための技術はまた、臨床状況では使用できない。例えば、Ｔ細胞から分離した後に常磁性ビーズを除去するプロセスは、細胞／ビーズ溶液を磁石の上に通過させることを要する。このプロセスは、Ｔ細胞とともに残っているビーズの数を大いに低減するが、そのビーズを完全には排除しない。ビーズを含む組成物を患者に移植すると、毒性効果が引き起こされ得る。ビーズ除去プロセスはまた、多くのＴ細胞が、機械的に解離した後ですら常磁性ビーズと会合したままであることから、治療に利用可能なＴ細胞の数を低減する。細胞喪失はまた、操作されているが、それ以外はビーズに結合していないＴ細胞に関して起こることもある。なぜならこれら細胞は、内部移行および／または機械的除去工程の前に洗い流されてしまうからである。

従って、ヒトの疾患（例えば、免疫不全障害、自己免疫障害、およびがん）の治療に容易に利用され得る、Ｔ細胞の単離を可能にする組成物および方法の必要性は未だ満たされていない。本発明の実施形態は、以下に詳細に記載され、これらの必要性に対処する。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】米国特許第６，３５２，６９４号明細書
【非特許文献】
【００１１】
【非特許文献１】Ｍｅｌｉｅｆら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．１４５：１６７－１７７（１９９５）

【非特許文献２】Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：５４５－５８６（１９９５）
【非特許文献３】Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：２３８－２４１（１９９２）
【非特許文献４】Ｙｅｅら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１６３７－１６４４（２０００）
【非特許文献５】Ｂｒｏｄｉｅら，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．５：３４－４１（１９９９）
【非特許文献６】Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：３１９－３３８（１９９２）
【非特許文献７】Ｒｉｄｄｅｌｌら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２８：１８９－２０１（１９９０）
【非特許文献８】Ｌｉｅｂｏｗｉｔｚら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１０，５３３－５４１，１９９８
【非特許文献９】Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８：１３４９（１９９０）
【非特許文献１０】Ｈａｒｄｉｎｇ，ら，Ｎａｔｕｒｅ ３５６：６０７，１９９２
【非特許文献１１】Ｄｕｄｌｅｙら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．，１６，６１２２－６１３１，２０１０
【非特許文献１２】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．，１７，４５５０－４５５７，２０１１
【非特許文献１３】Ｗｅｂｂら，Ｃｅｌｌ ６３：１２４９，１９９０
【非特許文献１４】Ｋａｗａｂｅら，Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２４５，１９９１
【非特許文献１５】Ｋａｂｅｌｉｔｚら，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：１３８１，１９９２
【非特許文献１６】Ｇｒｏｕｘら，Ｅｕｒ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：１６２３，１９９３
【非特許文献１７】Ｓｐｒｉｎｇｅｒら，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５：２２３，１９８７
【非特許文献１８】Ｂｉｅｒｅｒら，Ａｄｖ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：４９，１９９１
【非特許文献１９】Ｊｕｎｅら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １５：３２１（１９９４）
【非特許文献２０】Ｌｉｎｓｌｅｙら，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１：１９１（１９９３）
【非特許文献２１】Ｓｍｉｔｈら，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３３２：４２３－４３２（１９７９）
【非特許文献２２】Ｇｉｌｌｉｓら，Ｎａｔｕｒｅ ２６８：１５４－１５６（１９７７）
【非特許文献２３】Ｇｉｍｍｉら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：６５７５（１９９１）
【非特許文献２４】Ｌｉｎｄｓｔｅｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：３３９（１９８９）
【非特許文献２５】Ｆｒａｓｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：３１３（１９９１）
【非特許文献２６】Ｌｅｎｓｃｈｏｗら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：７８９（１９９２）
【非特許文献２７】Ｔｕｒｋａら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１１１０２（１９９２）
【非特許文献２８】Ｂａｒｏｊａら，Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１２０，２０５－２１７，１９８９
【非特許文献２９】Ｄａｍｌｅら，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１４３，１７６１－１７６７，１９８９）

【非特許文献３０】Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１１５，２４６－２５６，１９８８）
【非特許文献３１】Ｌｅｖｉｎｅら，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１５９，Ｎｏ．１２：ｐｐ．５９２１－５９３０，１９９７
【非特許文献３２】Ｇａｒｌｉｅら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２２（４）：３３６－４５，１９９９
【非特許文献３３】Ｓｈｉｂｕｙａら，Ａｒｃｈ Ｏｔｏｌａｒｙｎｇｏｌ Ｈｅａｄ Ｎｅｃｋ Ｓｕｒｇ，ｖｏｌ．１２６，Ｎｏ．４：４７３－４７９，２０００
【非特許文献３４】Ｒｕｂｂｉら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６６，２３３－２４１，１９９３

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１２】
発明の要旨
本発明は、Ｔ細胞を操作する、例えば、活性化する、刺激する、拡大する、増殖させる、または賦活する（ｅｎｅｒｇｉｚｉｎｇ）ための組成物および方法を提供する。この状況では、本発明の実施形態は、ある種のマーカーおよび／もしくは細胞表面レセプターを発現するか、またはＴ細胞媒介性免疫応答に最適なある種のサイトカインを生成する多数の（または実質的に純粋な部分集団の）活性化Ｔ細胞を生成するための方法を提供する。このような操作されたＴ細胞は、多くの疾患（例えば、がん、感染性疾患、自己免疫疾患、アレルギー、加齢に関連得る免疫機能不全、または処置にＴ細胞が望まれる任意の他の疾患状態）の処置および防止において使用され得る。本明細書で記載されるさらなる実施形態は、最適な反応性を有するＴ細胞を利用することによる、前述の疾患のうちのいずれかの有効な治療のための方法および組成物に関し、その細胞は、本発明の組成物および／または方法を使用して選択またはスクリーニングされる。本発明の組成物および方法は、多数の活性化Ｔ細胞を生成する能力に関するのみならず、インビボの状況でのこのようなＴ細胞の顕著に改善された有効性に関しても、既存の組成物および方法より有効である。従って、本発明の組成物および方法は、生着、自家移入のために、および治療適用のために非常に望ましいヒトＴリンパ球の生成に有用である。
【００１３】
よって、一実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；および上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。
【００１４】
一実施形態において、本発明は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるＴ細胞を隔離する抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。
【００１５】
一実施形態において、本発明は、上記ＳＬＢ層上に吸着された複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。
【００１６】
一実施形態において、本発明は、上記ＭＳＲ層上に吸着された複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。
【００１７】
一実施形態において、本発明は、放出制御様式において上記足場から放出される複数の

Ｔ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。いくつかの実施形態において、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、４５日間、５０日間、６０日間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、４ヶ月間、５ヶ月間、６ヶ月間、７ヶ月間、８ヶ月間、９ヶ月間、またはこれより長い期間にわたって、放出制御様式において上記足場から放出される。

【００１８】

一実施形態において、本発明は、１５日間までにわたって持続様式において上記足場から放出される、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。いくつかの実施形態において、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、４５日間、５０日間、６０日間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、４ヶ月間、５ヶ月間、６ヶ月間、７ヶ月間、８ヶ月間、９ヶ月間、またはこれより長い間にわたって、持続様式において上記足場から放出される。いくつかの実施形態において、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、少なくとも３０日間にわたって持続様式において上記足場から放出される。いくつかの実施形態において、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、少なくとも１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、４５日間、５０日間、６０日間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、４ヶ月間、５ヶ月間、６ヶ月間、７ヶ月間、８ヶ月間、９ヶ月間、またはこれより長い間にわたって、持続様式において上記足場から放出される。

【００１９】

一実施形態において、本発明は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、およびトランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、またはそのアゴニスト、その模倣物、その改変体、その機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。

【００２０】

一実施形態において、本発明は、ＩＬ－２、そのアゴニスト、その模倣物、その改変体、その機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせである複数のＴ細胞ホメオスタシス因子と、ＩＬ－７、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５、およびＩＬ－１５スーパーアゴニストからなる群より選択される第２のホメオスタシス因子とを含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。一実施形態において、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、ＩＬ－２の最初の３０アミノ酸（ｐ１－３０）、ＩＬ－２スーパーカインペプチド、およびＩＬ－２部分アゴニストペプチド、またはこれらの組み合わせを含むＮ末端ＩＬ－２フラグメントからなる群より選択され得る。

【００２１】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、上記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）上に吸着される。一実施形態において、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、親和性対形成または化学的カップリングを介して吸着され得る。いくつかの実施形態において、上記化学的カップリングは、クリックケミストリー試薬（例えば、ＤＢＣＯまたはアジド）を含む。一実施形態において、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、ビオチン－ストレプトアビジンの対、抗体－抗原の対、抗体－ハプテンの対、アプタマー親和性の

対、捕捉タンパク質の対、Ｆｃレセプター－ＩｇＧの対、金属－キレート化脂質の対、金属－キレート化脂質－ヒスチジン（ＨＩＳ）タグ化タンパク質の対、またはこれらの組み合わせを含む親和性対形成を介して吸着され得る。一実施形態において、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、アジド－アルキン化学（ＡＡＣ）反応、ジベンゾ－シクロオクチン連結（ＤＣＬ）、またはテトラジン－アルケン連結（ＴＡＬ）を含む化学的カップリングを介して吸着され得る。

【００２２】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、上記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）上に被覆される、あるいは、別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、上記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）に部分的に埋め込まれる。

【００２３】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、上記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）上に吸着される。

【００２４】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、抗体分子またはその抗原結合フラグメントである。

【００２５】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子は、抗ＣＤ３抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＣＤ２抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＣＤ４７抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗マクロファージスカベンジャーレセプター（ＭＳＲ１）抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）抗体もしくはその抗原結合フラグメント、ＭＨＣペプチドを負荷した主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子もしくはそのマルチマー、およびＭＨＣ－免疫グロブリン（Ｉｇ）結合体もしくはそのマルチマー、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００２６】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞共刺激分子は、ＣＤ２８、４．１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ２７（ＴＮＦＲＳＦ７）、ＧＩＴＲ（ＣＤ３５７）、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＨＶＥＭ（ＣＤ２７０）、ＬＴβＲ（ＴＮＦＲＳＦ３）、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ１）、ＣＲＴＡＭ（ＣＤ３５５），ＴＩＭ１（ＨＡＶＣＲ１、ＫＩＭ１）、ＣＤ２（ＬＦＡ２、ＯＸ３４）、ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０、ＳＬＡＭＦ１）、２Ｂ４（ＣＤ２４４、ＳＬＡＭＦ４）、Ｌｙ１０８（ＮＴＢＡ、ＣＤ３５２、ＳＬＡＭＦ６）、ＣＤ８４（ＳＬＡＭＦ５）、Ｌｙ９（ＣＤ２２９、ＳＬＡＭＦ３）、ＣＤ２７９（ＰＤ１）およびＣＲＡＣＣ（ＣＤ３１９、ＢＬＡＭＥ）からなる群より選択される共刺激抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントである。

【００２７】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子は、二重特異的抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。

【００２８】

別の実施形態において、本発明は、複数の活性化分子および共刺激分子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子は、ＣＤ３／ＣＤ２８、必要に応じてＣＤ２８とともにＣＤ３／ＩＣＯＳ、必要に応じてＣＤ２８とともにＣＤ３／ＣＤ２７、および必要に応じてＣＤ２８とともにＣＤ３／ＣＤ１３７、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される対を含む。

【００２９】

別の実施形態において、本発明は、Ｆｃ融合タンパク質に特異的に結合する免疫グロブリン分子をさらに含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関する。

【００３０】

別の実施形態において、本発明は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２１（ＣＣＬ－２１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド１９（ＣＣＬ－１９）、Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフケモカインリガンド１２（ＣＸＣＬ１２）、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、またはＦＭＳ様チロシンキナーゼ３（Ｆｌｔ－３）リガンド、またはこれらのアゴニスト、これらの模倣物、これらの改変体、これらの機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される動員化合物をさらに含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関する。一実施形態において、上記足場は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはそのアゴニスト、その模倣物、その改変体、またはその機能的フラグメントである動員化合物をさらに含む。

【００３１】

別の実施形態において、本発明は、抗原をさらに含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関する。一実施形態において、上記抗原は、腫瘍抗原を含む。さらになおこの実施形態の下では、上記腫瘍抗原は、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＣＥＡ、チロシナーゼ、ミッドカイン、ＢＡＧＥ、ＣＡＳＰ－８、β－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ＣＡ－１２５、ＣＤＫ－１、ＣＤＫ４、ＥＳＯ－１、ｇｐ７５、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１、ＭＵＣ－１、ＭＵＭ－１、ｐ５３、ＰＡＰ、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ｒａｓ、ｔｒｐ－１、ＨＥＲ－２、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＩＬ１３Ｒα、ＩＬ１３Ｒα２、ＡＩＭ－２、ＡＩＭ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｃ９ｏｒｆ　１１２、ＳＡＲＴ１、ＳＡＲＴ２、ＳＡＲＴ３、ＢＲＡＰ、ＲＴＮ４、ＧＬＥＡ２、ＴＮＫＳ２、ＫＩＡＡ０３７６、ＩＮＧ４、ＨＳＰＨ１、Ｃ１３ｏｒｆ２４、ＲＢＰＳＵＨ、Ｃ６ｏｒｆ１５３、ＮＫＴＲ、ＮＳＥＰ１、Ｕ２ＡＦ１Ｌ、ＣＹＮＬ２、ＴＰＲ、ＳＯＸ２、ＧＯＬＧＡ、ＢＭＩ１、ＣＯＸ－２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＺＨ２、ＬＩＣＡＭ、Ｌｉｖｉｎ、Ｌｉｖｉｎβ、ＭＲＰ－３、ネスチン、ＯＬＩＧ２、ＡＲＴ１、ＡＲＴ４、Ｂ－サイクリン、Ｇｌｉ１、Ｃａｖ－１、カテプシンＢ、ＣＤ７４、Ｅ－カドヘリン、ＥｐｈＡ２／Ｅｃｋ、Ｆｒａ－１／Ｆｏｓｌ　１、ＧＡＧＥ－１、ガングリオシド／ＧＤ２、ＧｎＴ－Ｖ、β１，６－Ｎ、Ｋｉ６７、Ｋｕ７０／８０、ＰＲＯＸ１、ＰＳＣＡ、ＳＯＸ１０、ＳＯＸ１１、サバイビン、ＵＰＡＲ、ＷＴ－１、ジペプチジルペプチダーゼ　ＩＶ（ＤＰＰＩＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤ　Ａｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸関連抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、Ｔ細胞レセプター／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－Ｉ、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＲＣＡＳｌ、α－フェトプロテイン、ｐｌ２０ｃｔｎ、Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、脳型グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－Ｉ、ＣＴ－７、ｃｄｃ２７、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、ＰｌＡ、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐ１５、ＧＭ２、ＧＤ２ガングリオシド、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、ｌｍｐ－１、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－Ｉ、ＵＬ１６結合タンパク質様転写物１（Ｍｕｌｔ１）、ＲＡＥ－１タンパク質、Ｈ６０、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、患者特異的様式で同定されるネオアンチゲン、またはこれらの免疫原性ペプチド、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【００３２】

関連する実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記支持脂質二重層（ＳＬＢ）　対　上記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）の重量比は、　約１０：１～約１：２０の間である。一実施形態において、上記重量比は、負荷前のＳＬＢ　対　ＭＳＲの比を反映する。別の実施形態において、上記重量比は、望ましい足場組成物を達成するために調節される。一実施形態において、上記ＳＬＢ　対　上記ＭＳＲの重量比は、約９：１～約１：１５の間、約５：１～約１：１０の間、約３：１～約１：５の間（その間の全ての比を含む）、例えば、約３；１、約２：１、約１：１、約１：２、約１：３、約１：４、約１：５、約１：６、約１：７、約１：８、約１：９、約１：１０であり得る。

【００３３】

別の実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）は、１４～２３個の炭素原子を含む脂質を含む。一実施形態において、上記脂質は、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジン酸（ＰＡ）、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、またはホスホイノシチド、またはこれらの誘導体である。一実施形態において、上記ＡＰＣ－ＭＳは、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、パルミトイル－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される脂質を含む流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含む。いくつかの実施形態において、上記脂質二重層は、哺乳動物の細胞膜（例えば、ヒト細胞の形質膜）の脂質組成を模倣する脂質組成を含む。多くの哺乳動物の細胞膜の脂質組成は、特徴づけられており、当業者によって容易に確認可能である（例えば、Ｅｓｓａｉｄら　Ｂｉｏｃｈｉｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ａｃｔａ　１８５８（１１）：　２７２５－３６（２０１６）（その内容全体が本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。いくつかの実施形態において、上記脂質二重層は、コレステロールを含む。いくつかの実施形態において、上記脂質二重層は、スフィンゴ脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記脂質二重層は、リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、上記脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスホイノシチド、６～２０個の炭素を含む飽和または不飽和のテールを有するホスホスフィンゴ脂質、またはこれらの組み合わせである。

【００３４】

別の実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記メソポーラスシリカマイクロロッド－脂質二重層（ＭＳＲ－ＳＬＢ）足場は、少なくとも１４日間にわたって連続流体体系を保持する。いくつかの実施形態において、上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、５０日間、またはこれより長い間にわたって連

続流体体系を保持する。いくつかの実施形態において、上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場のＭＳＲは、約１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、５０日間、または５０日間超で分解する。いくつかの実施形態において、上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場の脂質二重層は、約１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、５０日間、または５０日間超で分解する。

【００３５】

別の実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上で層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　上記Ｔ細胞活性化分子／共刺激分子の重量重量比は、約１：１～約５０：１の間である。一実施形態において、ＭＳＲ　対　Ｔ細胞活性化分子／共刺激分子の比は、上記ＭＳＲの重量　対　Ｔ細胞活性化分子／共刺激分子として使用される抗体の重量を反映する。別の実施形態において、上記ＭＳＲ：抗体重量比は、所望の足場組成物を達成するために調節される。一実施形態において、上記ＳＬＢ　対　抗体組成物の重量比は、約２：１～約２０：１の間、約３：１～約１０：１の間、約４：１～約８：１の間（その間の全ての比を含む）、例えば、約１：１、約２：１、約３：１、約４：１、約５：１、約６：１、約７：１、約８：１、約９：１、約１０：１、約１５：１、約２０：１、約２５：１、約３０：１、約４０：１である。

【００３６】

別の実施形態において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）に関し、ここで上記足場は、上記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）へのＴ細胞の浸潤を選択的に可能にするように積み重ねられる。一実施形態において、本発明は、ＡＰＣ－ＭＳをさらに提供し、ここで上記Ｔ細胞活性化分子および／または共刺激分子は、Ｔ細胞のインサイチュ操作を可能にするために十分な濃度で前記足場上に存在する。

【００３７】

別の局面において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）；ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。一実施形態において、本発明は、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、または筋肉内投与のために製剤化される薬学的組成物をさらに提供する。

【００３８】

別の局面において、本発明は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；上記ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；上記足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに上記足場に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）；ならびに上記足場の中にクラスター化されたＴ細胞を含む組成物に関する。一実施形態において、本発明は、ＡＰＣ－ＭＳ、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅ

ｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるＴ細胞を含む組成物をさらに提供する。

【００３９】

さらになお、本発明の実施形態は、必要性のある被験体において疾患を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；および上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって、上記被験体において上記疾患を処置する工程を包含する。一実施形態において、本発明はさらに、必要性のある被験体において疾患を処置するための方法に関し、ここで上記方法は、上記投与する工程の前に、上記Ｔ細胞の集団を再刺激する工程をさらに包含する。一実施形態において、上記方法は、２日間～５日間の間の期間にわたって上記足場と接触させた後に、上記Ｔ細胞の集団を拡大する工程を包含する。

【００４０】

別の治療的実施形態において、本発明は、必要性のある被験体において疾患を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含む、血液サンプル、骨髄サンプル、リンパ液サンプルまたは脾臓サンプルであるサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；および上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって、上記被験体において上記疾患を処置する工程を包含する。一実施形態において、上記被験体は、ヒト被験体である。一実施形態において、上記方法は、がんの処置のために提供し、上記足場は、少なくとも１種の細胞傷害性Ｔ細胞特異的活性化分子および少なくとも１種の細胞傷害性Ｔ細胞特異的共刺激分子を含む。

【００４１】

別の治療的実施形態において、本発明は、必要性のある被験体においてがんを処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；および上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって、上記被験体においてがんを処置する工程を包含する。一実施形態において、上記がんは、頭頚部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、食道がん、骨がん、精巣がん、子宮頚がん、消化器がん、膠芽腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺における前癌病変、結腸がん、黒色腫、および膀胱がんからなる群より選択される。一実施形態において、上記方法は、上記サンプルおよび／または上記拡大された細胞集団から、細胞傷害性Ｔ細胞をソートし、必要に応じて富化する工程をさらに包含し得る。

【００４２】

さらに別の治療的実施形態において、本発明は、必要性のある被験体において免疫不全障害を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；および上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって、上記被験体において免疫不全障害を処置する工程を包含する。一実施形態において、上記足場は、少なくとも１種のヘルパーＴ細胞（Ｔｈ）特異的活性化分子および少なくとも１種のヘルパーＴ細胞（Ｔｈ）特異的共刺激分子を含む。一実施形態において、上記方法は、原発性免疫不全障害および後天性免疫不全障害からなる群より

選択される免疫不全障害を処置するために使用され得る。一実施形態において、上記方法は、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）、またはディジョージ症候群（ＤＧＳ）、染色体切断症候群（ＣＢＳ）、毛細血管拡張性運動失調症（ＡＴ）およびウィスコットーオルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される遺伝性障害を処置するために使用され得る。

【００４３】

別の実施形態において、本発明は、必要性のある被験体において疾患を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；上記サンプルおよび／または上記拡大した細胞集団から、上記Ｔ細胞をさらにソートする工程であって、必要に応じて富化する工程；ならびに上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって上記被験体において上記疾患を処置する工程を包含する。一実施形態において、上記Ｔ細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択され得る。

【００４４】

別の実施形態において、本発明は、必要性のある被験体において自己免疫障害を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；上記サンプルおよび／または上記拡大した細胞集団から、上記Ｔ細胞をさらに必要に応じてソートし、富化する工程；ならびに上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと投与する工程であって、それによって上記被験体において自己免疫障害を処置する工程を包含する。

【００４５】

別の実施形態において、本発明は、必要性のある被験体において疾患を処置するための方法に関し、上記方法は、上記被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；上記Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；上記サンプルおよび／または上記拡大した細胞集団から、上記Ｔ細胞をさらに必要に応じてソートし、富化する工程；ならびに上記活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、上記被験体へと皮下投与または静脈内投与し、それによって上記被験体において上記疾患を処置する工程を包含する。一実施形態において、上記Ｔ細胞は、上記サンプルと上記足場とを、約１日間～約２０日間の間の期間にわたって接触させることによって、活性化され得、共刺激され得、ホメオスタシス的に維持され得、そして必要に応じて拡大され得る。

【００４６】

別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞の操作のための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大し、それによって、上記Ｔ細胞を操作する工程を包含する。一実施形態において、上記操作は、Ｔ細胞の刺激、活性化、生存性の変化、成長、分裂、分化、拡大、増殖、消耗、アネルギー、静止、アポトーシス、または死滅を促進することを包含し得る。一実施形態において、上記操作は、好ましくは、Ｔ細胞の拡大または増殖を促進することを包含する。さらなる実施形態において、上記操作されたＴ細胞は、さらに形質転換され得る。具体的実施形態において、上記Ｔ細胞は、キメラ抗原レセプター（ＣＡＲ）を発現するように形質転換され得る。上記ＣＡＲ

Ｔ細胞生成物は、上記ＣＡＲ　Ｔ細胞に対して特異的な抗原を含む上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とともにインキュベートすることによって、さらに拡大され得る。ある種の実施形態において、上記ＣＡＲ　Ｔ細胞特異的抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２２、またはこれらのフラグメントまたはこれらの改変体からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記ＣＡＲ　Ｔ細胞特異的抗原は、腫瘍抗原である。腫瘍抗原は、当該分野で周知であり、これらとしては、例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、β－ヒト絨毛性ゴナドトロピン、αフェトプロテイン（ＡＦＰ）、レクチン反応性ＡＦＰ、サイログロブリン、ＲＡＧＥ－１、ＭＮ－ＣＡ　ＩＸ、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、ＲＵ１、ＲＵ２（ＡＳ）、腸管カルボキシエステラーゼ、ｍｕｔ　ｈｓｐ７０－２、Ｍ－ＣＳＦ、前立腺、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、ＰＡＰ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＬＡＧＥ－１ａ、ｐ５３、プロステイン（ｐｒｏｓｔｅｉｎ）、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺がん腫瘍抗原－１（ＰＣＴＡ－１）、ＭＡＧＥ、ＥＬＦ２Ｍ、好中球エラスターゼ、エフリンＢ２、ＣＤ２２、インスリン増殖因子（ＩＧＦ）－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＩ、ＩＧＦ－Ｉレセプターおよびメソテリンが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＣＡＲ　Ｔ細胞生成物は、ＣＡＲ　Ｔ細胞のより大きな集団を生成するために、生成後にポリクローナル拡大され得る。

【００４７】

別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞の操作のための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を接触させる工程を包含し、ここで上記方法は、上記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および上記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与する。一実施形態において、上記方法は、上記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および上記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の拡大において約５０倍～８００倍の増大を付与する。

【００４８】

別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞の操作のための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を接触させる工程を包含し、ここで上記方法は、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与する。一実施形態において、上記方法は、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の拡大において約５倍～２０倍の増大を付与する。

【００４９】

別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞の代謝活性を改善するための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在する上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大し、それによってＴ細胞代謝活性を改善する工程を包含する。一実施形態において、上記方法は、上記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および上記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の改善された代謝活性を付与する。一実施形態において、上記方法は、上記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および上記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の約５倍～２０倍改善された代謝活性を付与する。一実施形態において、上記方法は、上記Ｔ

細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の改善された代謝活性を付与する。一実施形態において、上記方法は、上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に上記Ｔ細胞の集団の拡大において約１倍～１０倍の増大をさらに付与する。

【００５０】

別の実施形態において、本発明は、代謝的に活性なＴ細胞をスクリーニングするための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在する上記Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記活性化され、共刺激され、ホメオスタシス的に維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞の集団において代謝的に活性な細胞を同定する工程；それによって代謝的に活性なＴ細胞をスクリーニングする工程を包含する。一実施形態において、上記拡大されたＴ細胞は、上記足場との接触後に少なくとも約７日間にわたって代謝的に活性である。一実施形態において、上記拡大されたＴ細胞は、上記足場との接触後に少なくとも約７日間にわたって凝集物を形成する。

【００５１】

さらに別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞のポリクローナル集団を生成するための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記拡大されたＴ細胞における複数のマーカーの発現に基づいて、上記Ｔ細胞の拡大された集団からＴ細胞の特定の集団を同定する工程；上記Ｔ細胞の同定された集団を必要に応じて単離または精製する工程であって、それによって、Ｔ細胞のポリクローナル集団を生成する工程を包含する。一実施形態において、上記方法は、ＣＤ４＋　細胞またはＣＤ８＋　細胞のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。関連する実施形態において、上記方法は、ＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３＋　Ｔ細胞のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。さらになお、上記方法は、ＣＤ４４＋／ＣＤ６２Ｌ－　Ｔ細胞（エフェクターメモリーおよび／またはエフェクターＴ細胞）のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。別の実施形態において、上記方法は、ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞（活性化Ｔ細胞）のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。別の実施形態において、上記方法は、グランザイムＢ＋　ＣＤ８＋　Ｔ細胞（サイトトキシン分泌Ｔ細胞）のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。さらに別の実施形態において、上記方法は、ＩＦＮγ＋　Ｔ細胞（アクチベーターサイトカイン分泌Ｔ細胞）のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。さらに別の実施形態において、上記方法は、ＣＤ６２Ｌ＋／ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞（メモリーＴ細胞）のポリクローナル集団の生成のために適合され得る。

【００５２】

別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞のポリクローナル部分集団を生成するための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記拡大されたＴ細胞における複数のマーカーの発現に基づいて、上記Ｔ細胞の拡大された集団から消耗したＴ細胞の特定の集団を同定する工程；上記Ｔ細胞の同定された集団を必要に応じて除去する工程であって、それによって、Ｔ細胞のポリクローナル部分集団を生成する工程を包含する。一実施形態において、上記消耗したＴ細胞は、ＣＤ８＋／ＰＤ－１＋の細胞表面発現に基づいて同定または単離される。別の実施形態において、上記消耗したＴ細胞は、ＬＡＧ３＋／ＴＩＭ３＋の細胞表面発現に基づいて同定または単離される。

【００５３】
別の実施形態において、本発明は、エキソビボでのＴ細胞の操作のための方法に関し、上記方法は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）と被験体の生物学的サンプルとをエキソビボで接触させる工程であって、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大し、それによって、上記Ｔ細胞をエキソビボで操作する工程を包含する。一実施形態において、上記サンプルは、約１日間～約２０日間の期間にわたって上記足場と接触される。一実施形態において、上記方法は、上記操作されたＴ細胞によって生成される１種またはこれより多くのサイトカインまたはサイトトキシンの生成を検出する工程をさらに包含し得る。一実施形態において、上記方法は、上記操作されたＴ細胞による、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、組織壊死因子α（ＴＮＦα）、ＩＬ－２、ＩＬ－１、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３、ＩＬ－１７、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成をさらに検出する工程を包含する。
【００５４】
関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のエキソビボでの操作のための方法に関し、ここで上記操作されたＴ細胞は、Ｔヘルパー１（Ｔｈ１）細胞であり、上記方法は、ＩＬ－２、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）および組織壊死因子α（ＴＮＦα）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する。あるいは、関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のエキソビボでの操作のための方法に関し、ここで上記操作されたＴ細胞は、Ｔヘルパー２（Ｔｈ２）細胞であり、上記方法は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０およびＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する。さらになお関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のエキソビボでの操作のための方法に関し、ここで上記操作されたＴ細胞は、細胞傷害性Ｔ（Ｔｃ）細胞であり、上記方法は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）およびリンホトキシンα（ＬＴα／ＴＮＦβ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する。一実施形態において、上記操作されたＴ細胞は、細胞傷害性Ｔ（Ｔｃ）細胞であり、上記方法は、グランザイムまたはパーフォリン、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトトキシンの分泌を検出する工程を包含する。
【００５５】
関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のエキソビボでの操作のための方法に関し、ここで上記方法は、上記操作されたＴ細胞において細胞表面マーカーの発現を検出する工程をさらに包含する。一実施形態において、上記細胞表面マーカーは、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ６２Ｌ、ＦＯＸＰ３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ２８、およびＣＤ１３４、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される。代わりにまたはさらに、一実施形態において、上記細胞表面マーカーは、ＣＤ３６、ＣＤ４０、およびＣＤ４４、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される非Ｔ細胞マーカーである。
【００５６】
別の関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のエキソビボでの操作のための方法に関し、ここで上記被験体は、ヒト被験体である。
【００５７】
別の関連する実施形態において、本発明は、前述の方法に従うＴ細胞のインビボでの操作のための方法に関し、ここで上記足場は、上記Ｔ細胞を含む生物学的サンプルが上記足場とインビボで接触することを可能にするために、上記被験体に投与される。一実施形態において、上記足場は、約３日間～約１５日間の間の期間にわたって、好ましくは、約７日間～約１１日間の間の期間にわたって、上記被験体において維持され得る。いくつかの実施形態において、上記足場は、少なくとも１日間、少なくとも２日間、少なくとも３日間、少なくとも４日間、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少な

くとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１３日間、少なくとも１４日間、少なくとも１５日間、少なくとも１６日間、少なくとも１７日間、少なくとも１８日間、少なくとも１９日間、少なくとも２０日間、少なくとも２１日間、少なくとも２５日間、少なくとも３０日間、少なくとも３５日間、少なくとも４０日間、少なくとも５０日間、またはこれより長い期間にわたって、上記被験体において維持され得る。

【００５８】

さらに別の実施形態において、本発明は、上記抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を作製するための方法に関し、上記方法は、（ａ）高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層を提供する工程；（ｂ）上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子を上記ＭＳＲ上に必要に応じて負荷する工程；（ｃ）連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を、上記ＭＳＲを含む基部層上に層化する工程であって、それによって、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を生成する工程；（ｄ）工程（ｂ）が行われなかった場合に、上記Ｔ細胞ホメオスタシス因子を、上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場上に負荷する工程；（ｅ）上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場における１またはこれより多くの非特異的組み込み部位を、遮断因子で必要に応じて遮断する工程；ならびに（ｆ）上記Ｔ細胞活性化分子および上記Ｔ細胞共刺激分子を、上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場に負荷する工程であって、それによって上記ＡＰＣ－ＭＳを作製する工程を包含する。一実施形態において、上記方法は、複数の足場をアセンブルする工程であって、Ｔ細胞の浸潤を可能にする十分な多孔性を有する積み重ねを生成する工程をさらに包含し得る。一実施形態において、上記方法は、増殖因子、サイトカイン、インターロイキン、接着シグナル伝達分子、インテグリンシグナル伝達分子、またはこれらのフラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも１種のさらなる薬剤を負荷する工程を包含し得る。

【００５９】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００６０】

【図１】図１は、メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡画像を示す。上のパネルは、１：２０の脂質：ＭＳＲ比における上記脂質およびメソポーラスシリカマイクロロッドの合成写真を示す（スケール＝２００μｍ）。中央のパネルは、１：４の脂質：ＭＳＲ比における脂質およびメソポーラスシリカマイクロロッドの合成写真を示す（スケール＝２００μｍ）。下のパネルは、より高倍率でのＭＳＲと会合した脂質の位相差顕微鏡の合成写真を示す（スケール＝２０μｍ）。

【００６１】

【図２】図２Ａ、２Ｂ、２Ｃ、および２Ｄは、抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）のアセンブリおよび特性が、脂質のタイプおよび脂質の含有量に依存することを示す。図２Ａは、種々の脂質の化学構造を示す。略語：ＤＯＰＣ－ジオレオイルホスファチジルコリン；ＰＯＰＣ－パルミトイル－オレオイルホスファチジルコリン；およびＤＳＰＣ－ジステアロイルホスファチジルコリン。図２Ｂは、メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）および流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含む種々の組成物に保持される脂質のパーセンテージを示す。この実験では、２５０μｇ脂質のペイロードを、５００μｇ　ＭＳＲ組成物へと投入した。図２Ｃは、３７℃において２週間（１４日間）の期間にわたってリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中にＤＯＰＣ、ＰＯＰＣまたはＤＳＰＣを含む種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の相対的蛍光の変化を示す。図２Ｄは、３７℃において２週間（１４日間）の期間にわたって完全ロズウェルパーク記念研究所培地（ｃＲＰＭＩ）中にＤＯＰＣ、ＰＯＰＣまたはＤＳＰＣを含む種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の相対的蛍光の変化を示す。

【００６２】

【図３】図３は、位相差および蛍光顕微鏡法で分析した場合に、０日目、３日目、７日目、および１４日目におけるＰＢＳ中の種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の安定性を示す（脂質

被覆）。上のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＤＯＰＣの安定性を示す；中央のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＰＯＰＣの安定性を示す；そして下のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＤＳＰＣの安定性を示す。

【００６３】

【図４ＡＢＣ】図４Ａ、４Ｂ、４Ｃ、４Ｄ、および４Ｅは、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造のアセンブリおよび特性の変化を経時的に示す。図４Ａは、脂質組成物の退色前（ｐｒｅ）、退色直後（ｔ＝０）および退色の５分後（ｔ＝５分）に、高倍率で撮影したメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の位相差および蛍光顕微鏡画像を示す（スケール＝２μＭ）。図４Ｂは、光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）の変化を時間とともに示す。蛍光「ソース」は、領域（２）に示され、蛍光「吸い込み」は、領域（３）に示され、正規化点は、領域（１）に示される。差次的分布は、播種後の早い時点で最もよく認められ、およそ２分間（１２０秒間）で平衡に達した。図４Ｃは、正規化した画像から得られる場合、ＦＲＡＰにおける平均変化を示す平滑適合曲線（ｓｍｏｏｔｈ－ｆｉｔｔｉｎｇ　ｃｕｒｖｅ）を経時的に示す。図４Ｄおよび４Ｅは、脂質組成物の退色前（ｐｒｅ）、退色直後（ｔ＝０）および退色の３分後（ｔ＝３分）に、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造の２セットの高解像度画像を示す。

【図４ＤＥ】図４Ａ、４Ｂ、４Ｃ、４Ｄ、および４Ｅは、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造のアセンブリおよび特性の変化を経時的に示す。図４Ａは、脂質組成物の退色前（ｐｒｅ）、退色直後（ｔ＝０）および退色の５分後（ｔ＝５分）に、高倍率で撮影したメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の位相差および蛍光顕微鏡画像を示す（スケール＝２μＭ）。図４Ｂは、光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）の変化を時間とともに示す。蛍光「ソース」は、領域（２）に示され、蛍光「吸い込み」は、領域（３）に示され、正規化点は、領域（１）に示される。差次的分布は、播種後の早い時点で最もよく認められ、およそ２分間（１２０秒間）で平衡に達した。図４Ｃは、正規化した画像から得られる場合、ＦＲＡＰにおける平均変化を示す平滑適合曲線（ｓｍｏｏｔｈ－ｆｉｔｔｉｎｇ　ｃｕｒｖｅ）を経時的に示す。図４Ｄおよび４Ｅは、脂質組成物の退色前（ｐｒｅ）、退色直後（ｔ＝０）および退色の３分後（ｔ＝３分）に、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造の２セットの高解像度画像を示す。

【００６４】

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、種々の部分を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の構造的および機能的特性を示す。Ｂ３ＺレポーターＴ細胞株を使用する実験に基づいて、ＡＰＣ－ＭＳ足場の最大機能性を、個々の構成要素全てが足場に存在する場合に観察した。図５Ａは、フィコエリトリンビオチン（ビオチンＰＥ）（これは、ストレプトアビジン分子（例えば、ストレプトアビジンダイマー）に結合体化され、翻って、ビオチン化抗体（例えば、ビオチン化抗ＣＤ３抗体またはビオチン化抗ＣＤ２８抗体または別の特異的もしくは非特異的抗体）に結合体化される）を含むＰＯＰＣの脂質二重層を含むＡＰＣ－ＭＳの構造の模式図を示す。図５Ｂは、ＭＰＳ（シリカ）、ＰＯＰＣ（脂質）、ＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材、ビオチン化ＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材（ストレプトアビジンの存在下または非存在下）、ならびにフィコエリトリンビオチン（ビオチンＰＥ）および／もしくはストレプトアビジンの存在下または非存在下でビオチン化抗体と一緒にＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材の組み合わせでの処理後の、Ｂ３Ｚレポーター細胞β－ガラクトシダーゼ発現の分光光度分析を示す。吸光度の有意な増大は、個々の構成要素全て－ストレプトアビジンリンカーを介してビオチン化抗体に結合体化したホスホエタノールアミンビオチン（ビオチンＰＥ）を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物において観察される（濃いバー；＊＊は、統計的有意性を示す（ｐ＜０．００１、一元配置ＡＮＯＶＡを使用し、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用することによって分析；データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である）。

【００６５】

【図６】図６Ａおよび６Ｂは、ＩＬ－２を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物からのＩＬ－２の放出制御を示す。図６Ａは、ＩＬ－２を含むＭＳＲの多孔性構造の電子顕微鏡写真を示す（

スケールバー＝１００ｎｍ）。図６Ｂは、１５日間の期間にわたるＩＬ－２の累積放出レベルのプロットを示す。

【００６６】

【図７】図７Ａおよび７Ｂは、ＭＳＲ－ＳＬＢ複合材を含む抗原提示細胞模倣足場へのＴ細胞（球体）の浸潤を示す共焦点顕微鏡画像を示す。図７Ａは、２種の異なる色素で染色した細胞を示す。図７Ｂは、単一の色素で染色した細胞を示す（生細胞を示す）。

【００６７】

【図８】図８は、初代Ｔ細胞と共培養したメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の位相差顕微鏡画像および蛍光画像を示す。初代Ｔ細胞が、Ｔ細胞活性化のキューがその材料の表面に付着される場合に、細胞／材料クラスターを形成する傾向にあることを観察した。下のパネルは、結合体化抗体、ＩＬ－２、または結合体化抗体およびＩＬ－２の組み合わせを含むＭＳＲ－ＳＬＢ複合材における脂質およびメソポーラスシリカマイクロロッドの合成写真を示す。右側の画像は、結合体化抗体およびＩＬ－２の両方を含むＭＳＲ－ＳＬＢ複合材を高倍率で示す（スケール＝２０μｍ）。

【００６８】

【図９】図９Ａおよび９Ｂは、マウス脾臓Ｔ細胞における抗体誘導性変化の用量応答チャートを示す。図９Ａは、コントロール足場（モック；なし；ＰＯＰＣ脂質のみ；ならびにＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせ）および実験用足場（ＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせを抗体とともに含む）でのＴ細胞の３日間の刺激後のＴ細胞のポリクローナル拡大を示す。抗体の３種の異なる用量（ＭＳＲ：抗体比は１：５０、１：２５および１：１０）を研究した。図９Ｂは、コントロール足場（モック；なし；ＰＯＰＣ脂質のみ；ならびにＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせ）および実験用足場（ＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせを抗体とともに含む）でのＴ細胞の３日間の刺激後のＩＦＮγの分泌を示す。抗体の３種の異なる用量（ＭＳＲ：抗体比は１：５０、１：２５および１：１０）を研究した。

【００６９】

【図１０】図１０および図１１は、本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）が代謝的に活性なＴ細胞の迅速な拡大を促進することを示す。図１０は、コントロール（モック；なし；ＳＬＢ＋ＩＬ－２；ＤＹＮＡＢＥＡＤ＋ＩＬ－２）または実験用組成物とインキュベーションした際の初代Ｔ細胞の倍数拡大を示す。初代Ｔ細胞と本発明の組成物とをインキュベートすると、モック組成物またはＳＬＢなしの組成物と比較して、Ｔ細胞拡大（再刺激ありまたはなし）が有意に誘導された。より重要なことには、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳおよびＩＬ－２の組成物と比較して、初代Ｔ細胞と本発明の足場とをインキュベートすると、再刺激の際に７日目に測定可能により強い増殖が生じた。図１１は、ＩＬ－２を負荷した本発明の足場（ＳＬＢ／ＩＬ２／ＡＢＳ）またはＩＬ－２を負荷したＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ－ＩＬ２）とともにインキュベートしたＴ細胞の細胞代謝活性（細胞数に対して正規化したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ還元の相対的蛍光単位（ＲＦＵ）によって測定される場合）の棒グラフを示す。

【図１１】図１０および図１１は、本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）が代謝的に活性なＴ細胞の迅速な拡大を促進することを示す。図１０は、コントロール（モック；なし；ＳＬＢ＋ＩＬ－２；ＤＹＮＡＢＥＡＤ＋ＩＬ－２）または実験用組成物とインキュベーションした際の初代Ｔ細胞の倍数拡大を示す。初代Ｔ細胞と本発明の組成物とをインキュベートすると、モック組成物またはＳＬＢなしの組成物と比較して、Ｔ細胞拡大（再刺激ありまたはなし）が有意に誘導された。より重要なことには、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳおよびＩＬ－２の組成物と比較して、初代Ｔ細胞と本発明の足場とをインキュベートすると、再刺激の際に７日目に測定可能により強い増殖が生じた。図１１は、ＩＬ－２を負荷した本発明の足場（ＳＬＢ／ＩＬ２／ＡＢＳ）またはＩＬ－２を負荷したＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ－ＩＬ２）とともにインキュベートしたＴ細胞の細胞代謝活性（細胞数に対して正規化したＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ還元の相対的蛍光単位（ＲＦＵ）によって測定される場合）の棒グラフを示す。

【００７０】
【図１２】図１２Ａおよび１２Ｂは、本発明の足場（ＡＰＣ－ＭＳ）が脾臓Ｔ細胞（マウス）のポリクローナル拡大を付与し、Ｔ細胞凝集物の形成を促進することを示す。図１２Ａは、０日目、３日目、および７日目に、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした際の脾臓Ｔ細胞の凝集物の顕微鏡写真（４×倍率）を示す。図１２Ｂは、０日目、３日目、および７日目に、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした際の脾臓Ｔ細胞の凝集物の顕微鏡写真（１０×倍率）を示す（白いスケールバー＝１００μＭ）。
【００７１】
【図１３Ａ】図１３Ａおよび１３Ｂは、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートした際のマウス脾臓Ｔ細胞のポリクローナル拡大を示す。図１３Ａは、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後に、種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図を示す。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。フローデータを、各サンプルに関して、各時点で、蛍光マイナス１（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｍｉｎｕｓ　ＯＮＥ）（ＦＭＯ）コントロールに対してゲート制御した。データは、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図１３Ｂは、種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＡＰＣ－ＭＳ（四角）またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（三角）とともにインキュベートした後のＣＤ４＋　対　ＣＤ８＋　Ｔ細胞部分集団のパーセンテージにおける変化を示す線グラフである。７日間のインキュベーション後に、その細胞を２つの部分集団に分けた。ここで第１の部分集団を、再刺激し（破線）、第２の部分集団を、ＩＬ－２で処理した（実線）。ＡＰＣ－ＭＳを、ＡＰＣ－ＭＳ条件の再刺激のために使用し、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ条件を再刺激するために使用した。
【図１３Ｂ】図１３Ａおよび１３Ｂは、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートした際のマウス脾臓Ｔ細胞のポリクローナル拡大を示す。図１３Ａは、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後に、種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図を示す。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。フローデータを、各サンプルに関して、各時点で、蛍光マイナス１（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｍｉｎｕｓ　ＯＮＥ）（ＦＭＯ）コントロールに対してゲート制御した。データは、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図１３Ｂは、種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＡＰＣ－ＭＳ（四角）またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（三角）とともにインキュベートした後のＣＤ４＋　対　ＣＤ８＋　Ｔ細胞部分集団のパーセンテージにおける変化を示す線グラフである。７日間のインキュベーション後に、その細胞を２つの部分集団に分けた。ここで第１の部分集団を、再刺激し（破線）、第２の部分集団を、ＩＬ－２で処理した（実線）。ＡＰＣ－ＭＳを、ＡＰＣ－ＭＳ条件の再刺激のために使用し、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ条件を再刺激するために使用した。
【００７２】
【図１４】図１４は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＦｏｘＰ３＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大の測定を示す。結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示す。ここでＸ軸上の値は、ＦｏｘＰ３＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。四角形のゲートを適用して、種々の画分におけるＦｏｘＰ３＋　細胞の数および／または割合を計数した。示されるように、特定の製剤で

ＦｏｘＰ３＋　マウス脾臓Ｔ細胞の拡大は制限されたかまたは存在しなかった。

【００７３】

【図１５】図１５は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ６２Ｌ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を示す。結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示す。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ６２Ｌ＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４４＋染色の強度を示す。ＣＤ６２Ｌ＋　細胞は、散布図の右側（上および下の象限）に出現する。

【００７４】

【図１６】図１６は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を示す。結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ６９＋染色の強度を示す。ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　細胞は、散布図の右上の象限に出現する。

【００７５】

【図１７】図１７は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を示す。結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、グランザイムＢ＋染色の強度を示す。ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋細胞は、散布図の右上の象限に出現する。

【００７６】

【図１８】図１８は、ＡＰＣ－ＭＳ（四角）またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（三角）でのインキュベーション後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＩＦＮγのＴ細胞分泌（ｐｇ／細胞）を示す。７日間のインキュベーション後に、細胞を２つの部分集団に分けた。ここで第１の部分集団を、再刺激し（破線）、第２の部分集団をＩＬ－２で処理した（実線）。ここでは、ＡＰＣ－ＭＳを、ＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした細胞集団およびＤＹＮＡＢＥＡＤとともにインキュベートした細胞集団の両方の再刺激において使用した。

【００７７】

【図１９】図１９は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＰＤ－１＋　マウス脾臓Ｔ細胞のレベルを示す。結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＰＤ－１＋染色（消耗の潜在的マーカー）の強度を示す。

【００７８】

【図２０】図２０Ａおよび２０Ｂは、ヒト末梢血Ｔ細胞を種々の組成物とともにインキュベートすることの効果を示す。図２０Ａは、コントロール足場または実験用足場とともにインキュベートした初代Ｔ細胞の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのポリクローナル拡大の線グラフを示す。コントロール足場は、偽（「モック」；黒い線）組成物およびＳＬＢを含まない組成物（「なし」；赤い線）を含む。

実験用足場は、（１）ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（青い線）および（２）本発明の脂質二重層（ＳＬＢ）（緑の線）を含む。図２０Ｂは、コントロール足場または実験用足場とともにインキュベートした初代Ｔ細胞の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）での代謝活性（標準的なＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ染色アッセイで測定）を示す棒グラフを示す。コントロール足場は、偽組成物（「モック」；「ｍ」）およびＳＬＢを含まない組成物（「なし」；「ｆ」）を含む。実験用足場は、（１）ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（「ｄ」）および（２）本発明の脂質二重層（ＳＬＢ）（「ｓ」）を含む。

【００７９】

【図２１】図２１Ａおよび２１Ｂは、ヒト末梢血Ｔ細胞を種々の抗ＣＤ３抗体とともにインキュベートすることの効果を示す。被験体１（図２１Ａ）および被験体２（図２１Ｂ）から得られたヒト血液サンプルを、コントロール足場（「モック」）または列挙した抗ＣＤ３抗体－ムロモナブ（ＯＫＴ３）、ＣＤ３抗原／Ｔ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）複合体内のＣＤ３の１７～１９ｋＤ　ε鎖を認識する抗体（ＨＩＴ３ａ）、およびＣＤ３ｅ内のＴＣＲ複合体の２０ｋＤａサブユニットを認識するモノクローナル抗体（ＵＣＨＴ１）を含む実験用足場とともにインキュベートした。３種の異なる投与量を調査した－５μｇ（上のスライド）、１μｇ（被験体２の下のスライド）および０．５μｇ（被験体１の下のスライド）。各場合において、共刺激を、抗ＣＤ２８抗体で提供した。ここで抗ＣＤ３抗体：抗ＣＤ２８抗体の比を、１：１において維持した。Ｔ細胞の倍数拡大を、種々の時点（ｔ＝０日間、７日間、１１日間および１３日間）で測定した。

【００８０】

【図２２】図２２は、コントロール足場（「モック」）または列挙した抗ＣＤ３抗体－ＯＫＴ３、ＨＩＴ３ａ、およびＵＣＨＴ１を含む実験用足場とのインキュベーションの際のヒトＴ細胞のポリクローナル拡大を示す。下のパネルは、刺激分子としての抗ＣＤ３抗体および共刺激分子としての抗ＣＤ２８抗体の各々を含むＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーション後の種々の時点（ｔ＝８日間、１１日間および１４日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図を示す。散布図のＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。その散布図は、上のパネルの線グラフ（これは、前述の抗ＣＤ３抗体－ＯＫＴ３（丸）、ＨＩＴ３ａ（四角）およびＵＣＨＴ１（三角）を含むＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーション後のＣＤ４＋　対　ＣＤ８＋　Ｔ細胞部分集団のパーセンテージにおける変化を示す）にまとめられる。２種の異なる抗体投与量を調査した－５μｇ（１×希釈）および０．５μｇ（１：１０×希釈）。

【００８１】

【図２３】図２３は、１×負荷濃度（約５μｇ）において、ＩＬ－２ならびに前述の抗ＣＤ３抗体－ＯＫＴ３（左のパネル）、ＨＩＴ３ａ（中央のパネル）およびＵＣＨＴ１（右のパネル）、および抗ＣＤ２８抗体を１：１比において含むＡＰＣ－ＭＳを使用して、１４日間拡大した生きているＴ細胞上でのＣＤ６２ＬおよびＣＣＲ７の発現を示す。全生細胞におけるＣＤ６２ＬおよびＣＣＲ７の発現は、上のパネルに示され、ゲート制御したＣＤ８＋　細胞におけるこれらマーカーの発現は、下のパネルに示される。本発明のＡＰＣ－ＭＳで拡大した細胞の大部分は、１４日間のインキュベーション後にＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋（これは、ヒト患者におけるインビボ機能性によって重要であることが示されている）を保持する。さらに、ＯＫＴ３を含むＡＰＣ－ＭＳ足場は、ＵＣＨＴ１および／またはＨＩＴ３ａを含む足場と比較して、ＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞を拡大および／または保持するにあたって特に有効であった。

【００８２】

【図２４】図２４は、本発明の足場を作製するための代表的スキームを概説する。

【００８３】

【図２５】図２５Ａおよび２５Ｂは、抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）のデザインを示す。図２５Ａは、ＡＰＣ－ＭＳを調製するための例示的プロセスを示す：　１）メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を合成する；　２）ＭＳＲにＩＬ－２を吸着させる；　３）ＩＬ－２吸着したＭＳＲをリポソームで被覆し、ＭＳＲ－ＳＬＢを形成する

；　４）Ｔ細胞活性化のキューを、ＭＳＲ－ＳＬＢの表面に付着させる；　５）ＭＳＲ－ＳＬＢを、Ｔ細胞とともに培養する；および６）　ＭＳＲ－ＳＬＢを沈殿させ、積み重ねて、Ｔ細胞が浸潤した足場を形成する。ＩＬ－２を負荷し、Ｔ細胞活性化のキューで表面官能化したＭＳＲ－ＳＬＢから形成される足場を、ＡＰＣ－ＭＳという。図２５Ｂは、別個のＡＰＣ－ＭＳ製剤の例示的構造および機能を示す。ＩＬ－２は、ＡＰＣ－ＭＳから時間を経て放出され、局所のＴ細胞へのＩＬ－２の傍分泌送達を生じる。リポソーム製剤へのビオチン化リン脂質の所定の量の組み込みは、ストレプトアビジン－ビオチン相互作用を介してビオチン化Ｔ細胞活性化のキューの正確な表面付着を可能にし、天然のＡＰＣによるＴ細胞へのキューの細胞表面提示を模倣する。ポリクローナルＴ細胞拡大のために、ＣＤ３（αＣＤ３）およびＣＤ２８（αＣＤ２８）に対する活性化抗体が付着される（左）。抗原特異的Ｔ細胞拡大のために、ペプチドを負荷したＭＨＣ（ｐＭＨＣ）およびαＣＤ２８が付着される（右）。

【００８４】

【図２６】図２６Ａおよび２６Ｂは、ＭＳＲ－ＳＬＢをアセンブリするために使用される構成要素の物理的特徴付けを示す。図２６Ａは、ＭＳＲの代表的な明視野顕微鏡画像を示す。スケールバー＝１００μｍ。図２６Ｂは、動的光散乱法（ＤＬＳ）によって測定される場合のＰＯＰＣリポソームのサイズ分布を示す。図２６Ｂにおけるデータは、３つのサンプルの平均サイズ分布を表す。

【００８５】

【図２７】図２７Ａおよび２７Ｂは、脂質被覆ＭＳＲの顕微鏡画像を示す。図２７Ａは、低い脂質：ＭＳＲにおいてＭＳＲの凝集を示す顕微鏡画像である。ＭＳＲ（左）、発蛍光団タグ化リン脂質（全脂質のうちの１モル％；中央）、ならびにＭＳＲおよび脂質の共局在（右）の明視野画像を示す脂質被覆ＭＳＲ（脂質：ＭＳＲ　１：２０　ｗ／ｗ）の代表的顕微鏡画像。スケールバー＝２００μｍ。図２７Ｂは、ＭＳＲ（左）、発蛍光団タグ化リン脂質（全脂質のうちの１モル％；中央）、ならびにＭＳＲおよび脂質の共局在（右）の明視野画像を示す脂質被覆ＭＳＲ（脂質：ＭＳＲ　１：４　ｗ／ｗ）の顕微鏡画像である。スケールバー＝２００μｍ。

【００８６】

【図２８ＡＢ】図２８Ａ～２８Ｅは、ＡＰＣ－ＭＳのアセンブリおよび特徴付けを示す。図２８Ａは、細胞培養条件を維持したＰＢＳまたは１０％　血清を含むＲＰＭＩ培地（ｃＲＰＭＩ）のいずれかの中でのＭＳＲ上の脂質被覆（１モル％　発蛍光団タグ化脂質を含む）の保持を経時的に示す。図２８Ｂは、標準的細胞培養条件下で、経時的にｃＲＰＭＩ中で維持された脂質被覆ＭＳＲ（ＭＳＲ、明視野；脂質（１モル％　発蛍光団タグ化脂質）、緑）の代表的な重ね合わせた蛍光顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｃは、ＭＳＲ－ＳＬＢ（５００μｇのＭＳＲ）からインビトロで経時的（データ点）に放出されたＩＬ－２の定量を１フェーズ指数関数フィット（破線；R^2＝０．９８）とともに示すグラフである。データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｄは、０．０１モル％、０．１モル％、または１モル％のビオチン化脂質を含む脂質製剤で被覆したＭＳＲ上への種々の投入量のビオチン化ＩｇＧの付着の定量を示すグラフである。棒の上の値は、各それぞれの条件についての付着したＩｇＧの濃度（μｇ）を示す。データは、４回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｅは、初代ヒトＴ細胞とＡＰＣ－ＭＳとの密な会合を示すＳＥＭ画像である。スケールバー＝１０μｍ。

【図２８ＣＤＥ】図２８Ａ～２８Ｅは、ＡＰＣ－ＭＳのアセンブリおよび特徴付けを示す。図２８Ａは、細胞培養条件を維持したＰＢＳまたは１０％　血清を含むＲＰＭＩ培地（ｃＲＰＭＩ）のいずれかの中でのＭＳＲ上の脂質被覆（１モル％　発蛍光団タグ化脂質を含む）の保持を経時的に示す。図２８Ｂは、標準的細胞培養条件下で、経時的にｃＲＰＭＩ中で維持された脂質被覆ＭＳＲ（ＭＳＲ、明視野；脂質（１モル％　発蛍光団タグ化脂質）、緑）の代表的な重ね合わせた蛍光顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。

データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｃは、ＭＳＲ－ＳＬＢ（５００μｇのＭＳＲ）からインビトロで経時的（データ点）に放出されたＩＬ－２の定量を１フェーズ指数関数フィット（破線；R^2＝０．９８）とともに示すグラフである。データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｄは、０．０１モル％、０．１モル％、または１モル％のビオチン化脂質を含む脂質製剤で被覆したＭＳＲ上への種々の投入量のビオチン化ＩｇＧの付着の定量を示すグラフである。棒の上の値は、各それぞれの条件についての付着したＩｇＧの濃度（μｇ）を示す。データは、４回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図２８Ｅは、初代ヒトＴ細胞とＡＰＣ－ＭＳとの密な会合を示すＳＥＭ画像である。スケールバー＝１０μｍ。

【００８７】

【図２９】図２９は、Ｔ細胞とＡＰＣ－ＭＳとの会合を示す。低倍率（左）および高倍率（右）での、初代マウスＴ細胞とともに１日間培養した、いかなる表面キューも提示しない（ｃｕｅ－）、またはαＣＤ３およびαＣＤ２８を表面提示する（ｃｕｅ＋）かのいずれかのＭＳＲ－ＳＬＢの代表的顕微鏡画像。細胞および物質は、明視野画像（上）の中で認識でき、ＭＳＲ－ＳＬＢ脂質被覆は、緑色チャネルにおいて認識できる（１モル％　発蛍光団タグ化脂質；中央）。合成画像を、下に示す。低倍率のスケールバー＝５００μｍ、高倍率のスケールバー＝１００μｍ。

【００８８】

【図３０ＡＢＣ】図３０Ａ、３０Ｂ、３０Ｃ、３０Ｄ、３０Ｅ、３０Ｆ、および３０Ｇは、初代マウスおよびヒトＴ細胞のポリクローナル拡大を示す。図３０Ａは、低倍率（左）または高倍率（右）において、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともに培養した初代マウスＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。図３０Ｂは、非処理（モック）であったか、または遊離キュー（１１０ｎＭ　αＣＤ３、１１０ｎＭ　αＣＤ２８、１．３μｇ／ｍｌ　ＩＬ－２）、市販のＣＤ３／ＣＤ２８マウスＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）、二重層表面上に提示されるＴ細胞キューなしのＩＬ－２負荷ＭＳＲ－ＳＬＢ（ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃｕｅ－））、またはＡＰＣ－ＭＳ（αＣＤ３、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養したかのいずれかである初代マウスＴ細胞の拡大を示す。モックおよび遊離の曲線は、ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃｕｅ－）曲線から区別できなかった。図３０Ｃは、ＦＡＣＳによって測定して、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤｙｎａｂｅａｄ培養物において生きている単一の細胞の中でＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　細胞の出現率を経時的に示す。データを、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用して分析した。図３０Ｄは、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した初代ヒトＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、ならびに（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。図３０Ｅは、非処理であったか（モック）、または市販のＣＤ３／ＣＤ２８ヒトＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）とともに、または種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養したかのいずれかである初代ヒトＴ細胞の拡大を示す。図３０Ｆは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに１４日間拡大したサンプル中の、生きている単一のＣＤ３＋　細胞の中でのＣＤ４およびＣＤ８単一陽性細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｇは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに拡大されたサンプル中、生きている単一細胞の中でＰＤ－１およびＬＡＧ－３を共発現す

る細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３回の実験複製の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図３０Ｅにおけるデータは、２回の独立した実験からの少なくとも３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図３０ＤＥ】図３０Ａ、３０Ｂ、３０Ｃ、３０Ｄ、３０Ｅ、３０Ｆ、および３０Ｇは、初代マウスおよびヒトＴ細胞のポリクローナル拡大を示す。図３０Ａは、低倍率（左）または高倍率（右）において、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともに培養した初代マウスＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。図３０Ｂは、非処理（モック）であったか、または遊離キュー（１１０ｎＭ　αＣＤ３、１１０ｎＭ　αＣＤ２８、１．３μｇ／ｍｌ　ＩＬ－２）、市販のＣＤ３／ＣＤ２８マウスＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）、二重層表面上に提示されるＴ細胞キューなしのＩＬ－２負荷ＭＳＲ－ＳＬＢ（ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃｕｅ－））、またはＡＰＣ－ＭＳ（αＣＤ３、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養したかのいずれかである初代マウスＴ細胞の拡大を示す。モックおよび遊離の曲線は、ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃｕｅ－）曲線から区別できなかった。図３０Ｃは、ＦＡＣＳによって測定して、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤｙｎａｂｅａｄ培養物において生きている単一の細胞の中でＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　細胞の出現率を経時的に示す。データを、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用して分析した。図３０Ｄは、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した初代ヒトＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、ならびに（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。図３０Ｅは、非処理であったか（モック）、または市販のＣＤ３／ＣＤ２８ヒトＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）とともに、または種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養したかのいずれかである初代ヒトＴ細胞の拡大を示す。図３０Ｆは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに１４日間拡大したサンプル中の、生きている単一のＣＤ３＋　細胞の中でのＣＤ４およびＣＤ８単一陽性細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｇは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに拡大されたサンプル中、生きている単一細胞の中でＰＤ－１およびＬＡＧ－３を共発現する細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３回の実験複製の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図３０Ｅにおけるデータは、２回の独立した実験からの少なくとも３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図３０ＦＧ】図３０Ａ、３０Ｂ、３０Ｃ、３０Ｄ、３０Ｅ、３０Ｆ、および３０Ｇは、初代マウスおよびヒトＴ細胞のポリクローナル拡大を示す。図３０Ａは、低倍率（左）または高倍率（右）において、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともに培養した初代マウスＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。図３０Ｂは、非処理（モック）であったか、または遊離キュー（１１０ｎＭ　αＣＤ３、１１０ｎＭ　αＣＤ２８、１．３μｇ／ｍｌ　ＩＬ－２）、市販のＣＤ３／ＣＤ２８マウスＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）、二重層表面上に提示されるＴ細胞キューなしのＩＬ－２負荷ＭＳＲ－ＳＬＢ（ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃ

ｕｅ－））、またはＡＰＣ－ＭＳ（αＣＤ３、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養したかのいずれかである初代マウスＴ細胞の拡大を示す。モックおよび遊離の曲線は、ＭＳＲ－ＳＬＢ（ｃｕｅ－）曲線から区別できなかった。図３０Ｃは、ＦＡＣＳによって測定して、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤｙｎａｂｅａｄ培養物において生きている単一の細胞の中でＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　細胞の出現率を経時的に示す。データを、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用して分析した。図３０Ｄは、種々の時点での、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した初代ヒトＴ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像である。スケールバー＝１００μｍ。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、ならびに（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。図３０Ｅは、非処理であったか（モック）、または市販のＣＤ３／ＣＤ２８ヒトＴ細胞拡大ビーズおよび外因性ＩＬ－２（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）とともに、または種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養したかのいずれかである初代ヒトＴ細胞の拡大を示す。図３０Ｆは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに１４日間拡大したサンプル中の、生きている単一のＣＤ３＋　細胞の中でのＣＤ４およびＣＤ８単一陽性細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｇは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかとともに拡大されたサンプル中、生きている単一細胞の中でＰＤ－１およびＬＡＧ－３を共発現する細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３回の実験複製の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。図３０Ｅにおけるデータは、２回の独立した実験からの少なくとも３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表す。図３０Ｆおよび３０Ｇにおけるデータは、３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。

【００８９】

【図３１】図３１は、ポリクローナル拡大した初代マウスＴ細胞上のＣＤ４およびＣＤ８発現の代表的ＦＡＣＳプロットを示す。ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳのいずれかでポリクローナル拡大した生きている単一の細胞上のＣＤ４およびＣＤ８発現を示す代表的ＦＡＣＳプロット。フローデータを、各サンプルに関して、各時点において蛍光マイナス１（ＦＭＯ）コントロールに対してゲート制御した。データは、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【００９０】

【図３２ＡＢ】図３２Ａ、３２Ｂ、３２Ｃおよび３２Ｄは、ポリクローナル拡大した初代マウスＴ細胞の拡大した表現型特徴づけを示す。図３２Ａは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかで拡大したサンプルにおける生きている単一ＣＤ８＋　細胞の中でのグランザイムＢ陽性細胞のＦＡＣＳ定量（左）および代表的ＦＡＣＳプロット（右）を示す。図３２Ｂは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかで拡大したサンプルにおける生きている単一ＣＤ４＋　細胞の中でのＦｏｘＰ３陽性細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３２Ｃおよび３２Ｄは、ＣＤ８発現の関数として、生きている単一細胞上でＰＤ－１発現を示す代表的ＦＡＣＳプロットを示す。フローデータを、各サンプルに関して、各時点において、蛍光マイナス１（ＦＭＯ）コントロールに対してゲート制御した。データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【図３２ＣＤ】図３２Ａ、３２Ｂ、３２Ｃおよび３２Ｄは、ポリクローナル拡大した初代マウスＴ細胞の拡大した表現型特徴づけを示す。図３２Ａは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかで拡大したサンプルにおける生きている単一ＣＤ８＋　細胞の中

でのグランザイムＢ陽性細胞のＦＡＣＳ定量（左）および代表的ＦＡＣＳプロット（右）を示す。図３２Ｂは、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかで拡大したサンプルにおける生きている単一ＣＤ４＋　細胞の中でのＦｏｘＰ３陽性細胞のＦＡＣＳ定量を示す。図３２Ｃおよび３２Ｄは、ＣＤ８発現の関数として、生きている単一細胞上でＰＤ－１発現を示す代表的ＦＡＣＳプロットを示す。フローデータを、各サンプルに関して、各時点において、蛍光マイナス１（ＦＭＯ）コントロールに対してゲート制御した。データは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【００９１】

【図３３】図３３は、ポリクローナル拡大した初代ヒトＴ細胞上の接着分子発現を示す。ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたは種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤のいずれかで拡大したサンプルにおけるＣＤ６２ＬおよびＣＣＲ７を共発現する生きている単一細胞のＦＡＣＳ定量。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、および（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したαＣＤ３およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。データは、３つの異なるドナーサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【００９２】

【図３４ＡＢＣＤ】図３４Ａ、３４Ｂ、３４Ｃ、３４Ｄ、および３４Ｅは、初代マウスＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３４Ａは、Ｈ－２Ｋ（ｂ）において無関係のペプチド（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ（配列番号３）；左）または関連ペプチド（ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）；右）を提示するＡＰＣ－ＭＳとともに２日間培養した初代ＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像を示す。スケールバー＝１００μｍ。図３４Ｂは、非処理（モック）であったか、または種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養したかのいずれかである初代ＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の拡大を示す。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、ならびに（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。図３４Ｃは、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大し、次いで、モック適用した（－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）ペプチドを適用した（＋）かのいずれかであるＢ１６－Ｆ１０細胞と共培養した、生きている単一のＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によるＩＦＮγおよびＴＮＦα発現のＦＡＣＳ定量を示す。図３４Ｄは、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大し、次いで、種々のエフェクター：標的細胞比で共培養したＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞による、モック適用した（－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）適用（＋）したＢ１６－Ｆ１０標的細胞のインビトロ殺滅の定量を示す。図３４Ｅは、モック適用した（ｐｅｐ－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）ペプチドを適用した（ｐｅｐ＋）かのいずれかであるＢ１６－Ｆ１０細胞と種々のエフェクター：標的細胞比での共培養に応じて、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大したＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によるＩＦＮγ分泌の定量を示す。図３４Ｂ、３４Ｃ、３４Ｄ、および３４Ｅにおけるデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【図３４Ｅ】図３４Ａ、３４Ｂ、３４Ｃ、３４Ｄ、および３４Ｅは、初代マウスＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３４Ａは、Ｈ－２Ｋ（ｂ）において無関係のペプチド（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ（配列番号３）；左）または関連ペプチド（ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）；右）を提示するＡＰＣ－ＭＳとともに２日間培養した初代ＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の代表的な明視野顕微鏡画像を示す。スケールバー＝１００μｍ。図３４Ｂは、非処理（モック）であったか、または種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養したかのいずれかである初代ＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞の拡大を示す。（Ｆ１）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ２）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、（Ｆ３）３３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ、ならびに（Ｆ４）３３μｇ／ｍｌのＭＳＲにおいて初期培養物に投入したＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）およびαＣＤ２８飽和０．１モル％　ビオチン化脂質を提示するＡＰＣ－ＭＳ。図３４Ｃは、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大し、次いで、モック適用した（－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）ペプチドを適用した（＋）かのいずれかであるＢ１６－Ｆ１０細胞と共培養した、生きている単一のＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によるＩＦＮγおよびＴＮＦα発現のＦＡＣＳ定量を示す。図３４Ｄは、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大し、次いで、種々のエフェクター：標的細胞比で共培養したＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞による、モック適用した（－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）適用（＋）したＢ１６－Ｆ１０標的細胞のインビトロ殺滅の定量を示す。図３４Ｅは、モック適用した（ｐｅｐ－）かまたはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）ペプチドを適用した（ｐｅｐ＋）かのいずれかであるＢ１６－Ｆ１０細胞と種々のエフェクター：標的細胞比での共培養に応じて、種々のＡＰＣ－ＭＳ製剤で１３日間拡大したＣＤ８＋　ＯＴ－Ｉ　Ｔ細胞によるＩＦＮγ分泌の定量を示す。図３４Ｂ、３４Ｃ、３４Ｄ、および３４Ｅにおけるデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。

【００９３】

【図３５ＡＢＣＤ】図３５Ａ、３５Ｂ、３５Ｃ、３５Ｄおよび３５Ｅは、抗原特異的ＡＰＣ－ＭＳ製剤で拡大した初代ヒトＴ細胞の拡大した特徴づけを示す。図３５Ａは、モック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物の全拡大を示す。モック処理細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３５Ｂ、３５Ｃおよび３５Ｄは、適用しなかった（ペプチド－）（図３５Ｂ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド）（図３５Ｃ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド）（図３５Ｄ）のいずれかであったＴ２細胞との共培養後に、モック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＣＬＧペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ　ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（ＡＰＣ－ＭＳＧＬＣ）のいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物のＩＦＮγ分泌の定量を示す。モック処理した細胞のデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３５Ｅは、適用しなかった（ペプチドなし；上）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；中央）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；下）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、ＣＬＧペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ／ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ／ＧＬＣ）のいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物のＩＦＮγおよびＴＮＦα発現を示す代表的なＦＡＣＳプロットを示す。図３５Ａおよび３５Ｂにおけるデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【図３５Ｅ】図３５Ａ、３５Ｂ、３５Ｃ、３５Ｄおよび３５Ｅは、抗原特異的ＡＰＣ－Ｍ

Ｓ製剤で拡大した初代ヒトＴ細胞の拡大した特徴づけを示す。図３５Ａは、モック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物の全拡大を示す。モック処理細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３５Ｂ、３５Ｃおよび３５Ｄは、適用しなかった（ペプチドー）（図３５Ｂ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド）（図３５Ｃ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド）（図３５Ｄ）のいずれかであったＴ２細胞との共培養後に、モック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＣＬＧペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ　ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（ＡＰＣ－ＭＳＧＬＣ）のいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物のＩＦＮγ分泌の定量を示す。モック処理した細胞のデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３５Ｅは、適用しなかった（ペプチドなし；上）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；中央）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；下）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、ＣＬＧペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ／ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（ＡＰＣ－ＭＳ／ＧＬＣ）のいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物のＩＦＮγおよびＴＮＦα発現を示す代表的なＦＡＣＳプロットを示す。図３５Ａおよび３５Ｂにおけるデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【００９４】

【図３６ＡＢＣ】図３６Ａ、３５Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、３６Ｊ、３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍ、および３６Ｎは、初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、および３６Ｊは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物からの初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂおよび３６Ｄは、ＥＢＶ由来ペプチドＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）（ＣＬＧ；図３６Ａおよび３６Ｂ）およびＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）（ＧＬＣ；図３６Ｄおよび３６Ｅ）に特異的な生きているＣＤ８＋　単一細胞のテトラマー分析を示す。それぞれのテトラマーに特異的な生きている単一ＣＤ８＋　細胞の％を示すゲートの中の数とともに代表的なＦＡＣＳプロット（図３６Ａおよび３６Ｄ）、ならびにモック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧペプチドもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ＨＬＡ－Ａ２＋　ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の種々の時点でのＦＡＣＳデータの定量（図３６Ｂおよび３６Ｅ）。モック処理した細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｆは、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したかのいずれかであるＣＬＧ（図３６Ｃ）もしくはＧＬＣ（図３６Ｆ）に特異的な初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の拡大を示す。モック処理した細胞に関するデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｇ、３６Ｈおよび３６Ｉは、適用していない（ペプチドー；図３６Ｇ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；図３６Ｈ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；図３６Ｉ）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養した生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率を示す。モック処理した細胞に関するデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｊは、ＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳで１４日間拡大した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞による、モック適用した（ペプチドなし）か、またはＣＬＧペプチド（＋ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（＋ＧＬＣ）のいずれかを適用したＴ２標的細胞のインビトロでの殺滅の定量を示す。図３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍおよび３６Ｎは、ＰＢＭＣに由来する初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ｋは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣ

ペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内で、生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中のＧＬＣ特異的細胞の出現率を示す。図３６Ｌは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内でのＧＬＣ特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞の数を示す。棒の上の数字は、倍数拡大（平均±ｓ．ｄ．）を示す。図３６Ｍおよび３６Ｎは、適用しなかった（ペプチドなし）、ＣＬＧペプチドを適用したか（＋ＣＬＧ）、もしくはＧＬＣペプチドを適用したか（＋ＧＬＣ）かのいずれかであるＴ２との共培養後に、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣに由来する生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率（図３６Ｍ）、ならびにＩＦＮγ分泌（図３６Ｎ）を示す。全てのデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【図３６ＤＥＦ】図３６Ａ、３５Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、３６Ｊ、３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍ、および３６Ｎは、初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、および３６Ｊは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物からの初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂおよび３６Ｄは、ＥＢＶ由来ペプチドＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）（ＣＬＧ；図３６Ａおよび３６Ｂ）およびＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）（ＧＬＣ；図３６Ｄおよび３６Ｅ）に特異的な生きているＣＤ８＋　単一細胞のテトラマー分析を示す。それぞれのテトラマーに特異的な生きている単一ＣＤ８＋　細胞の％を示すゲートの中の数とともに代表的なＦＡＣＳプロット（図３６Ａおよび３６Ｄ）、ならびにモック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧペプチドもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ＨＬＡ－Ａ２＋　ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の種々の時点でのＦＡＣＳデータの定量（図３６Ｂおよび３６Ｅ）。モック処理した細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｆは、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したかのいずれかであるＣＬＧ（図３６Ｃ）もしくはＧＬＣ（図３６Ｆ）に特異的な初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の拡大を示す。モック処理した細胞に関するデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｇ、３６Ｈおよび３６Ｉは、適用していない（ペプチド－；図３６Ｇ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；図３６Ｈ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；図３６Ｉ）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養した生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率を示す。モック処理した細胞に関するデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｊは、ＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳで１４日間拡大した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞による、モック適用した（ペプチドなし）か、またはＣＬＧペプチド（＋ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（＋ＧＬＣ）のいずれかを適用したＴ２標的細胞のインビトロでの殺滅の定量を示す。図３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍおよび３６Ｎは、ＰＢＭＣに由来する初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ｋは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内で、生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中のＧＬＣ特異的細胞の出現率を示す。図３６Ｌは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内でのＧＬＣ特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞の数を示す。棒の上の数字は、倍数拡大（平均±ｓ．ｄ．）を示す。図３６Ｍおよび３６Ｎは、適用しなかった（ペプチドなし）、ＣＬＧペプチドを適用したか（＋ＣＬＧ）、もしくはＧＬＣペプチドを適用したか（＋ＧＬＣ）かのいずれかであるＴ２との共培養後に、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示

するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣに由来する生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率（図３６Ｍ）、ならびにＩＦＮγ分泌（図３６Ｎ）を示す。全てのデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【図３６ＧＨＩＪ】図３６Ａ、３５Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、３６Ｊ、３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍ、および３６Ｎは、初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、および３６Ｊは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物からの初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂおよび３６Ｄは、ＥＢＶ由来ペプチドＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）（ＣＬＧ；図３６Ａおよび３６Ｂ）およびＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）（ＧＬＣ；図３６Ｄおよび３６Ｅ）に特異的な生きているＣＤ８＋　単一細胞のテトラマー分析を示す。それぞれのテトラマーに特異的な生きている単一ＣＤ８＋　細胞の％を示すゲートの中の数とともに代表的なＦＡＣＳプロット（図３６Ａおよび３６Ｄ）、ならびにモック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧペプチドもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ＨＬＡ－Ａ２＋　ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の種々の時点でのＦＡＣＳデータの定量（図３６Ｂおよび３６Ｅ）。モック処理した細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｆは、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したかのいずれかであるＣＬＧ（図３６Ｃ）もしくはＧＬＣ（図３６Ｆ）に特異的な初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の拡大を示す。モック処理した細胞に関するデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｇ、３６Ｈおよび３６Ｉは、適用していない（ペプチド－；図３６Ｇ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；図３６Ｈ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；図３６Ｉ）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養した生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率を示す。モック処理した細胞に関するデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｊは、ＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳで１４日間拡大した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞による、モック適用した（ペプチドなし）か、またはＣＬＧペプチド（＋ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（＋ＧＬＣ）のいずれかを適用したＴ２標的細胞のインビトロでの殺滅の定量を示す。図３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍおよび３６Ｎは、ＰＢＭＣに由来する初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ｋは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内で、生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中のＧＬＣ特異的細胞の出現率を示す。図３６Ｌは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内でのＧＬＣ特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞の数を示す。棒の上の数字は、倍数拡大（平均±ｓ．ｄ．）を示す。図３６Ｍおよび３６Ｎは、適用しなかった（ペプチドなし）、ＣＬＧペプチドを適用したか（＋ＣＬＧ）、もしくはＧＬＣペプチドを適用したか（＋ＧＬＣ）かのいずれかであるＴ２との共培養後に、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣに由来する生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率（図３６Ｍ）、ならびにＩＦＮγ分泌（図３６Ｎ）を示す。全てのデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【図３６ＫＬＭＮ】図３６Ａ、３５Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、３６Ｊ、３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍ、および３６Ｎは、初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂ、３６Ｃ、３６Ｄ、３６Ｅ、３６Ｆ、３６Ｇ、３６Ｈ、３６Ｉ、および３６Ｊは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞単離物からの初代ヒトＴ細胞の抗原特異

的拡大を示す。図３６Ａ、３６Ｂおよび３６Ｄは、ＥＢＶ由来ペプチドＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）（ＣＬＧ；図３６Ａおよび３６Ｂ）およびＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）（ＧＬＣ；図３６Ｄおよび３６Ｅ）に特異的な生きているＣＤ８＋　単一細胞のテトラマー分析を示す。それぞれのテトラマーに特異的な生きている単一ＣＤ８＋　細胞の％を示すゲートの中の数とともに代表的なＦＡＣＳプロット（図３６Ａおよび３６Ｄ）、ならびにモック処理した（３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２）か、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧペプチドもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳ（ｐＭＨＣ、αＣＤ２８、ＩＬ－２を負荷）とともに培養した初代ＨＬＡ－Ａ２＋　ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の種々の時点でのＦＡＣＳデータの定量（図３６Ｂおよび３６Ｅ）。モック処理した細胞のデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｆは、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養したかのいずれかであるＣＬＧ（図３６Ｃ）もしくはＧＬＣ（図３６Ｆ）に特異的な初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞の拡大を示す。モック処理した細胞に関するデータは、０日目および７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｇ、３６Ｈおよび３６Ｉは、適用していない（ペプチド－；図３６Ｇ）か、ＣＬＧペプチドを適用した（＋ＣＬＧペプチド；図３６Ｈ）か、もしくはＧＬＣペプチドを適用した（＋ＧＬＣペプチド；図３６Ｉ）かのいずれかであるＴ２細胞との共培養後に、モック処理したか、またはＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養した生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率を示す。モック処理した細胞に関するデータは、７日目に関してのみ利用可能。図３６Ｊは、ＨＬＡ－Ａ２においてＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳで１４日間拡大した初代ヒトＣＤ８＋　Ｔ細胞による、モック適用した（ペプチドなし）か、またはＣＬＧペプチド（＋ＣＬＧ）もしくはＧＬＣペプチド（＋ＧＬＣ）のいずれかを適用したＴ２標的細胞のインビトロでの殺滅の定量を示す。図３６Ｋ、３６Ｌ、３６Ｍおよび３６Ｎは、ＰＢＭＣに由来する初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大を示す。図３６Ｋは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内で、生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中のＧＬＣ特異的細胞の出現率を示す。図３６Ｌは、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣ内でのＧＬＣ特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞の数を示す。棒の上の数字は、倍数拡大（平均±ｓ．ｄ．）を示す。図３６Ｍおよび３６Ｎは、適用しなかった（ペプチドなし）、ＣＬＧペプチドを適用したか（＋ＣＬＧ）、もしくはＧＬＣペプチドを適用したか（＋ＧＬＣ）かのいずれかであるＴ２との共培養後に、３０　Ｕ／ｍｌ　ＩＬ－２（モック）中で、またはＨＬＡ－Ａ２においてＧＬＣペプチドを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに７日間培養したＰＢＭＣに由来する生きている単一ＣＤ８＋　Ｔ細胞の中でのＴＮＦα＋ＩＦＮγ＋　細胞の出現率（図３６Ｍ）、ならびにＩＦＮγ分泌（図３６Ｎ）を示す。全てのデータは、３回の実験反復の平均±ｓ．ｄ．を表し、２つの異なるドナーサンプルでの２回の実験の代表である。

【００９５】

【図３７】図３７は、インビトロでのＡＰＣ－ＭＳ足場の分解を示す。αＣＤ３／αＣＤ２８（１％　ビオチン化脂質）を提示し、ＩＬ－２を放出するＡＰＣ－ＭＳ（１６７μｇ）を、初代マウスＴ細胞とともに培養した（２５×10^4　Ｔ細胞／１６７μｇ　ＡＰＣ－ＭＳ）。種々の時点において、培養物を、７００　ｒｃｆにおいて５分遠心分離し、ペレット中のＳｉ含有量を、誘導結合プラズマ発光分光分析（ＩＣＰ－ＯＥＳ；　Ｇａｌｂｒａｉｔｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を介して定量した。Ｓｉは、培養開始後１週間まで培養物ペレットにおいて検出不能である。

【００９６】

【図３８】図３８は、ＡＰＣ－ＭＳからの多様な可溶性免疫指向性ペイロードの放出制御を示す。４種のＡＰＣ－ＭＳを生成した（各々、脂質被覆の前に５００μｇ　ＡＰＣ－ＭＳに負荷された、ＩＬ－２、ＩＬ－２１、ＴＧＦβまたはＩＬ－１５ＳＡのうちのいずれ

か２μｇを含む）。サンプルを徹底して洗浄して、負荷されていないタンパク質を除去し、その後、３７℃において２８日間まで維持した。経時的なペイロード放出を、ＥＬＩＳＡを介して評価した。

【００９７】

【図３９】図３９Ａおよび３９Ｂは、１０％　カルボキシフルオレセインヘッド基タグ化脂質を含むＭＳＲ－ＳＬＢを使用する光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）実験を示す。図３９Ａは、３回の独立したＦＲＡＰ事象の代表的な画像である。画像は、光退色前（左）、光退色直後（中央）、および蛍光回復後（右）の蛍光タグ化ＭＳＲ－ＳＬＢを示す。光退色領域は、赤い矢印によって示される。図３９Ｂは、蛍光回復の定量を経時的に示す。異なるＭＳＲ－ＳＬＢに対する８回の独立した光退色の蛍光回復を、黒の破線で示し、平均傾向を、実線で示す。

【００９８】

【図４０ＡＢ】図４０Ａ、４０Ｂ、４０Ｃ、および４０Ｄは、ＤＹＮＡＢＥＡＤと比較して、ＡＰＣ－ＭＳを使用して行ったＴ細胞拡大実験の結果を示す。ここでＤＹＮＡＢＥＡＤの量を、ＡＰＣ－ＭＳと同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を含むように正規化した。図４０Ａ。全タンパク質定量のためのビシコニン酸アッセイ（ＢＣＡ）分析を行って、市販のマウスまたはヒトＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔ細胞アクチベーターＤＹＮＡＢＥＡＤＳの表面に結合したタンパク質の量を決定した。ＤＹＮＡＢＥＡＤストック溶液を徹底的に洗浄し、ＤＹＮＡＢＥＡＤ抗体負荷を、ＢＣＡアッセイを介して評価した。マウスおよびヒトＴ細胞に標的化されたＤＹＮＡＢＥＡＤは、類似の抗体負荷（約２０μｇ／ｍｌ）を有することが見出された。細胞あたりの基準では、５：１のＤＹＮＡＢＥＡＤ：細胞比（条件Ｄ－Ｂ）は、１６．７μｇにおいて投入された０．１％　Ｔ細胞キューを提示するＡＰＣ－ＭＳ（条件Ｍ－Ｄ）と同じ用量の抗ＣＤ２８／抗ＣＤ３抗体に相当した。図４０Ｂ。初代マウスＴ細胞の用量依存性拡大を、１３日間の培養期間にわたってＡＰＣ－ＭＳで観察したが、その試験した用量範囲内でＤＹＮＡＢＥＡＤでは観察しなかった。ＡＰＣ－ＭＳは、同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を提示するＤＹＮＡＢＥＡＤＳと比較して、増強されたＴ細胞拡大を有意に促進した（条件Ｍ－Ｄ　対　Ｄ－Ｂを参照のこと）。図４０Ｃ。より大きな拡大にも拘わらず、ＡＰＣ－ＭＳ条件Ｍ－Ｄで拡大した細胞は、同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を提示するＤＹＮＡＢＥＡＤ（条件Ｄ－Ｂ）で拡大した細胞と比較して、消耗マーカー（ｅｘｈａｕｓｔｉｏｎ　ｍａｒｋｅｔｓ）ＰＤ－１およびＬＡＧ－３の増強した共発現を示さなかった。図４０Ｄ。低用量から中程度の用量のＤＹＮＡＢＥＡＤで拡大したＴ細胞は、主にＣＤ４に傾いた非対称性を示した（条件Ｄ－Ａ、Ｄ－Ｂ）。ＤＹＮＡＢＥＡＤを極めて高用量で添加した場合、中程度のＣＤ８に傾いた非対称性が観察された（条件Ｄ－Ｃ）。対照的に、ＡＰＣ－ＭＳは、非対称性の程度はＡＰＣ－ＭＳの製剤に依存して、重くＣＤ８に傾いた非対称性を示す傾向にあった。図４０Ｂ、４０Ｃおよび４０Ｄにおけるデータは、４匹の異なるマウスに由来するサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊＊ｐ＜０．００１、（ｂ）二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用して分析。

【図４０ＣＤ】図４０Ａ、４０Ｂ、４０Ｃ、および４０Ｄは、ＤＹＮＡＢＥＡＤと比較して、ＡＰＣ－ＭＳを使用して行ったＴ細胞拡大実験の結果を示す。ここでＤＹＮＡＢＥＡＤの量を、ＡＰＣ－ＭＳと同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を含むように正規化した。図４０Ａ。全タンパク質定量のためのビシコニン酸アッセイ（ＢＣＡ）分析を行って、市販のマウスまたはヒトＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔ細胞アクチベーターＤＹＮＡＢＥＡＤＳの表面に結合したタンパク質の量を決定した。ＤＹＮＡＢＥＡＤストック溶液を徹底的に洗浄し、ＤＹＮＡＢＥＡＤ抗体負荷を、ＢＣＡアッセイを介して評価した。マウスおよびヒトＴ細胞に標的化されたＤＹＮＡＢＥＡＤは、類似の抗体負荷（約２０μｇ／ｍｌ）を有することが見出された。細胞あたりの基準では、５：１のＤＹＮＡＢＥＡＤ：細胞比（条件Ｄ－Ｂ）は、１６．７μｇにおいて投入された０．１％　Ｔ細胞キューを提示するＡＰＣ－ＭＳ（条件Ｍ－Ｄ）と同じ用量の抗ＣＤ２８／抗ＣＤ３抗体に相当した。図４０Ｂ

。初代マウスＴ細胞の用量依存性拡大を、１３日間の培養期間にわたってＡＰＣ－ＭＳで観察したが、その試験した用量範囲内でＤＹＮＡＢＥＡＤでは観察しなかった。ＡＰＣ－ＭＳは、同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を提示するＤＹＮＡＢＥＡＤＳと比較して、増強されたＴ細胞拡大を有意に促進した（条件Ｍ－Ｄ　対　Ｄ－Ｂを参照のこと）。図４０Ｃ。より大きな拡大にも拘わらず、ＡＰＣ－ＭＳ条件Ｍ－Ｄで拡大した細胞は、同じ量の抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体を提示するＤＹＮＡＢＥＡＤ（条件Ｄ－Ｂ）で拡大した細胞と比較して、消耗マーカー（ｅｘｈａｕｓｔｉｏｎ　ｍａｒｋｅｔｓ）ＰＤ－１およびＬＡＧ－３の増強した共発現を示さなかった。図４０Ｄ。低用量から中程度の用量のＤＹＮＡＢＥＡＤで拡大したＴ細胞は、主にＣＤ４に傾いた非対称性を示した（条件Ｄ－Ａ、Ｄ－Ｂ）。ＤＹＮＡＢＥＡＤを極めて高用量で添加した場合、中程度のＣＤ８に傾いた非対称性が観察された（条件Ｄ－Ｃ）。対照的に、ＡＰＣ－ＭＳは、非対称性の程度はＡＰＣ－ＭＳの製剤に依存して、重くＣＤ８に傾いた非対称性を示す傾向にあった。図４０Ｂ、４０Ｃおよび４０Ｄにおけるデータは、４匹の異なるマウスに由来するサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊＊ｐ＜０．００１、（ｂ）二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定を使用して分析。

【００９９】

【図４１】図４１Ａおよび４１Ｂは、ＤＹＮＡＢＥＡＤと比較してＩＬ－２用量の初代マウスＴ細胞拡大に対する効果およびＡＰＣ－ＭＳからの徐放性を評価するために行った実験の結果を示す。図４１Ａは、ＩＬ－２を負荷したＡＰＣ－ＭＳ（Ｍ－Ｄ）、培地に添加したＡＰＣ－ＭＳおよびＩＬ－２（Ｍ－Ｄ　ｂＩＬ２）；ＤＹＮＡＢＥＡＤ（Ｄ－Ｂ）または培地に添加したＤＹＮＡＢＥＡＤおよびＩＬ－２（Ｄ－Ｂ　ｂＩＬ－２）のいずれかで処理した初代マウスＴ細胞の拡大を示す。Ｄ－Ｂ：ＤＹＮＡＢＥＡＤ　５：１；　Ｄ－Ｂ－ｂＩＬ－２：ＤＹＮＡＢＥＡＤ　５：１＋ＩＬ－２ボーラス；　Ｍ－Ｄ：０．１％Ｔ細胞キュー／１：１０Ｘ　材料／負荷ＩＬ－２；　Ｍ－Ｓ／ｂＩＬ－２：　０．１％Ｔ細胞キュー／１Ｌ１０Ｘ　材料／ＩＬ－２ボーラス。図４１Ｂは、ＩＬ－２を負荷したＡＰＣ－ＭＳ（Ｍ－Ｄ）；培地に添加したＡＰＣ－ＭＳおよびＩＬ－２（Ｍ－Ｄ　ｂＩＬ２）；ＤＹＮＡＢＥＡＤ（Ｄ－Ｂ）；または培地に添加したＤＹＮＡＢＥＡＤおよびＩＬ－２（Ｄ－Ｂ　ｂＩＬ－２）のいずれかで拡大した初代マウスＴ細胞における消耗マーカーＰＤ－１およびＬＡＧ－３の共発現を示す。データは、４匹の異なるマウスに由来するサンプルの平均±ｓ．ｄ．を表し、少なくとも２回の独立した実験の代表である。＊＊＊ｐ＜０．００１、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ事後検定によって分析。

【０１００】

【図４２】図４２Ａおよび４２Ｂは、クリックケミストリー結合体化を介するＤＢＣＯ提示ＭＳＲ－ＳＬＢへのアジド標識ＩｇＧの付着を示す。図４２Ａ。種々の量のアジド改変ＩｇＧ（示されるとおり）を、種々の量のＤＢＣＯ改変脂質（示されるとおり）を含むＭＳＲ－ＳＬＢとともにインキュベートした。棒の上の値は、ＭＳＲ－ＳＬＢに付着されたアジド改変ＩｇＧのμｇを表す。図４２Ｂは、種々の量のＤＢＣＯ改変脂質を含むＭＳＲ－ＳＬＢに投入したアジド改変ＩｇＧのより広い用量滴定を示す。ｎＩｇＧは、アジド改変しなかったＩｇＧを表す。棒の上の値は、ＭＳＲ－ＳＬＢに付着されたアジド改変ＩｇＧのμｇを表す。

【発明を実施するための形態】

【０１０１】

発明の詳細な説明

本発明は、操作中のＴ細胞の問題に対する解決策を提供する。具体的には、本発明は、抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供し、この足場は、このような細胞の操作において有用である。その足場は、メソポーラスシリカロッド（ＭＳＲ）を含み、ＭＳＲは、連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を組み込むかまたはＳＬＢで被覆され、それによって、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を形成する。ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、複数のＴ細胞活性化分子お

よびＴ細胞共刺激分子を、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子とともにさらに含み、これらは一緒になって、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を模倣し、その足場が種々のエフェクター機能を標的細胞（例えば、Ｔ細胞）に対して誘起することを可能にする構造を構成する。いくつかの実施形態において、その足場は、標的細胞にある細胞表面分子とその足場によって提示される種々の結合パートナーとの間の直接的または間接的な相互作用を介して、これらの効果を媒介する。足場が使用される適用に依存して、その足場は、その足場自体の物理的または化学的特性を通じて、標的化された細胞の生存および成長を調節する。適用に依存して、足場組成物は、ある種の活性化シグナルおよび共刺激シグナル、ならびにホメオスタシスシグナル伝達分子を含むように改変され得、これらは一緒に作用して、標的細胞の種々のエフェクター機能、例えば、活性化、分裂を媒介し、分化、成長、拡大、再プログラミング、アネルギー、静止、老化、アポトーシスまたは死滅を促進する。これらの適用において、足場は、標的化した細胞の細胞代謝活性および成長を驚くほど改善することを見出した。さらに、本発明の足場によって付与される成長および代謝活性における改善は、既存のプラットフォーム（例えば、磁性ビーズ）より予測外に優れていた。

【０１０２】

特定の細胞（例えば、Ｔ細胞）の操作を可能にするために、足場組成物の透過性は、例えば、より大きなまたはより小さな孔サイズ、密度、ポリマー架橋、剛性、頑丈さ、延性、または弾性に関して材料を選択または操作することによって調節され得る。その足場組成物は、物理的チャネルまたは経路を含み得、これを通じて標的化された細胞が、その足場と相互作用する、および／またはその足場の特定の区画もしくは領域へと動く。その区画化を促進するために、その足場組成物は、区画または層（各々異なる透過性を有する）へと必要に応じて組織化され得、その結果細胞は、細胞のある種の部分集団のみへのアクセスを可能にするようにソートまたはフィルタにかけられる。足場における標的細胞集団の隔離はまた、その足場組成物の分解、脱水もしくは再水和、酸素化、化学的もしくはｐＨ変化、または自己アセンブリの継続によって調節され得る。それらの捕捉の後、その標的化された細胞は、刺激分子、サイトカイン、および足場に存在する他の補因子の助けを借りて、その足場内で成長または拡大することを可能にされ得る。他の例では、別の方法でその足場に浸潤した標的化されなかった細胞が、負の選択薬剤を使用して拒絶または除去され得る。

【０１０３】

本発明の足場内に含まれるかまたは隔離される細胞は、主に免疫細胞である。ある種の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞を隔離および／または操作するための足場に関する。他の実施形態において、本発明は、他のリンパ球、例えば、Ｂ細胞に透過可能である足場に関する。なお他の実施形態において、本発明は、足場の組み合わせ、例えば、Ｔ細胞足場およびＢ細胞足場の組み合わせに関する。免疫細胞、例えば、Ｔ細胞は、疾患の診断または治療において有用である別個の部分集団を同定するために必要に応じて採取および分析される。その採取された細胞はまた、治療において使用されるべきである組成物または製剤を開発するために、再プログラムまたは拡大され得る。

【０１０４】

本発明は、以下の小節においてより詳細にさらに詳述される。

【０１０５】

Ｉ．抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）

一実施形態において、本発明は、抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を提供する。その足場は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；そのＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；その足場上に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびにその足場上に吸着された、複数のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む。

【０１０６】

Ａ．メソポーラスシリカ

一実施形態において、本発明の足場の構成要素は、メソポーラスシリカを含む。メソポ

ーラスシリカは、立方最密充填され、円筒状の均一な孔を有する多孔性の本体である。この材料は、テンプレートとして界面活性剤のロッド様ミセル（これは、酸または塩基性触媒の存在下で水またはアルコール中にシリカ供給源（例えば、アルコキシシラン、ケイ酸ナトリウム溶液、カネマイト、シリカ微粒子）を溶解および加水分解することによって、水の中で形成される）を使用することによって合成される。米国公開番号２０１５－００７２００９およびＨｏｆｆｍａｎｎら，　Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ　Ｃｈｅｍｉｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，　４５，　３２１６－３２５１，　２００６を参照のこと。多くの種類の界面活性剤（例えば、カチオン性、アニオン性、および非イオン性の界面活性剤）が、界面活性剤として試験され、概して、カチオン性界面活性剤のアルキルトリメチルアンモニウム塩が、最高の比表面積および孔容積を有するメソポーラスシリカをもたらすことが公知になった。米国公開番号２０１３／００５２１１７およびＫａｔｉｙａｒら（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　１１２２（１－２）：　１３－２０）を参照のこと。用語「メソスケール（ｍｅｓｏｓｃａｌｅ）」、「メソポア（ｍｅｓｏｐｏｒｅ）」、「メソポーラス（ｍｅｓｏｐｏｒｏｕｓ）」などは、本明細書で使用される場合、５ｎｍ～１００ｎｍの範囲の、特に、２ｎｍ～５０ｎｍの範囲の外形サイズ（ｆｅａｔｕｒｅ　ｓｉｚｅ）を有する構造に言及し得る。よって、いくつかの実施形態において、メソポーラス材料は孔を含み、その孔は、規則正しく分布していてもよいし、無作為に分布していてもよく、５ｎｍ～１００ｎｍの範囲の直径を有する。

【０１０７】

本発明の足場において使用されるメソポーラスシリカは、種々の形態（例えば、マイクロスフェア、不規則な粒子、方形のロッド、円筒状のナノロッドなど）において提供され得るが、構造化されたロッド形態（ＭＳＲ）が、特に好ましい。粒子は、種々の所定の形状（例えば、回転楕円体形状、楕円体形状、ロッド様形状、または曲線状の円筒形状が挙げられる）を有し得る。メソポーラスシリカをアセンブリして、マイクロロッドを生成するための方法は、当該分野で公知である。Ｗａｎｇら，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　１５：１５０１，　２０１３を参照のこと。一実施形態において、メソポーラスシリカナノ粒子は、オルトケイ酸テトラエチルとミセル状ロッドから作製されたテンプレートとを反応させることによって合成される。その結果は、規則的な孔の配置で満たされたナノサイズのスフェアまたはロッドの集まりである。次いで、そのテンプレートは、適切なｐＨに調節された溶媒で洗浄することによって除去され得る。この例では、界面活性剤テンプレートの除去後に、均質な、規則正しい、かつ連続したメソ多孔性（ｍｅｓｏｐｏｒｏｓｉｔｙ）によって特徴づけられる親水性シリカナノ粒子が、例えば、約６００ｍ^2／ｇ～約１２００ｍ^2／ｇ、特に約８００ｍ^2／ｇ～約１０００ｍ^2／ｇおよび特に約８５０ｍ^2／ｇ～約９５０ｍ^2／ｇの比表面積を伴って調製される。別の実施形態において、そのメソポーラス粒子は、単純なゾルーゲル法または噴霧乾燥法を使用して合成され得る。オルトケイ酸テトラエチルはまた、さらなるポリマーモノマー（テンプレートとして）とともに使用される。さらに別の実施形態において、１種またはこれより多くのテトラアルコキシーシランおよび１種またはこれより多くの（３－シアノプロピル）トリアルコキシーシランは、共縮合（ｃｏ－ｃｏｎｄｅｎｓｅ）して、メソポーラスシリケート粒子をロッドとして提供し得る。米国公開番号２０１３－０１４５４８８、同第２０１２－０２６４５９９および同第２０１２－０２５６３３６（これらは、参考として援用される）を参照のこと。

【０１０８】

メソポーラスシリカロッドは、直径が２～５０ｎｍの間の孔、例えば、２～５ｎｍ、１０～２０ｎｍ、１０～３０ｎｍ、１０～４０ｎｍ、２０～３０ｎｍ、３０～５０ｎｍ、３０～４０ｎｍ、４０～５０ｎｍの間の孔を含み得る。特定の実施形態において、マイクロロッドは、直径がおよそ５ｎｍ、６ｎｍ、７ｎｍ、８ｎｍ、９ｎｍ、１０ｎｍ、１１ｎｍ、１２ｎｍの、またはこれより大きい孔を含む。その孔サイズは、適用のタイプに依存して変更され得る。

【０１０９】
別の実施形態において、マイクロロッドの長さは、マイクロメートルの範囲にあり、約５μｍ～約５００μｍの範囲に及ぶ。一例では、マイクロロッドは、５～５０μｍ、例えば、１０～２０μｍ、１０～３０μｍ、１０～４０μｍ、２０～３０μｍ、３０～５０μｍ、３０～４０μｍ、４０～５０μｍの長さを構成する。他の実施形態において、ロッドは、５０μｍ～２５０μｍの長さ、例えば、約６０μｍ、７０μｍ、８０μｍ、９０μｍ、１００μｍ、１２０μｍ、１５０μｍ、１８０μｍ、２００μｍ、２２５μｍ、または２２５μｍ超を構成する。細胞の動員のために、より高いアスペクト比を有するＭＳＲ組成物を使用することは好ましいことであり得る（例えば、ロッドは、５０μｍ～２００μｍの長さ、特に、８０μｍ～１２０μｍの長さ、特に、約１００μｍもしくはこれより長い長さを構成する）。

【０１１０】
さらに別の実施形態において、ＭＳＲは、標的細胞、例えば、Ｔ細胞への付着および／または結合のために、高表面積を提供する。高表面積メソポーラスシリケートを得るための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第８，８８３，３０８号および米国公開番号２０１１－０２５３６４３（これらの内容全体が、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。一実施形態において、高表面積は、ナノ粒子の繊維状の形態に起因し、このことは、高濃度の、表面上に高度に分散しかつ容易にアクセス可能な部分を得ることを可能にする。ある種の実施形態において、高表面積ＭＳＲは、少なくとも約１００m^2／ｇ、少なくとも１５０m^2／ｇ、または少なくとも３００m^2／ｇの表面積を有する。他の実施形態において、高表面積ＭＳＲは、約１００m^2／ｇ～約１０００m^2／ｇ（その中の全ての値または部分範囲を含み、例えば、５０m^2／ｇ、１００m^2／ｇ、２００m^2／ｇ、３００m^2／ｇ、４００m^2／ｇ、６００m^2／ｇ、８００m^2／ｇ、１００～５００m^2／ｇ、１００～３００m^2／ｇ、５００～８００m^2／ｇまたは５００～１０００m^2／ｇ）の表面積を有する。

【０１１１】
Ｂ．脂質
本発明の足場は、ＭＳＲ基部層上に連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含む。用語「脂質（ｌｉｐｉｄ）」とは一般に、水に不溶性であるという共通する特性を有する、生体系と関連する物質の不均質な群を意味し、低い極性の有機溶媒（例えば、クロロホルムおよびエーテル）によって細胞から抽出され得る。一実施形態において、「脂質」とは、長い脂肪酸の鎖（好ましくは、１０～３０個の炭素単位を含み、特に、１４～２３個の炭素単位を含み、特に、１６～１８個の炭素単位を含む）を含む、任意の物質に言及する。

【０１１２】
一実施形態において、脂質は、単層として提供される。別の実施形態において、脂質は、二重層として提供される。脂質二重層は、２層の脂質分子から作製される薄い極性の膜である。好ましくは、その脂質二重層は、流体であり、ここで個々の脂質分子は、単層内で迅速に拡散し得る。その膜脂質分子は、好ましくは両親媒性である。

【０１１３】
一実施形態において、脂質層は、連続する二重層であり、例えば、細胞形質膜のような天然の生物学的膜において見出されるものに似ている。別の実施形態において、脂質は、支持二重層（ＳＬＢ）の形態で提供される。ＳＬＢは、固体支持体、例えば、メソポーラスシリカロッド（ＭＳＲ）上に位置する平面構造である。このような配置では、その支持二重層の上側の面が露出される一方で、その支持二重層の内側の面は、支持体と接触した状態にある。ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、安定であり、高い流速または振動に供される場合にすら、十分に無傷なままであり、ホール、例えば、メソポーラスシリカ基部層の孔と整列されるホールに耐え得る。この安定性が原因で、数週間、そしてさらには数カ月間継続する実験が、支持二重層を用いて可能である。ＳＬＢはまた、多くの化学的および／または生物学的部分での改変、誘導体化および化学的結合体化に反応しやすい。

【０１１４】

一実施形態において、ＳＬＢは、任意の公知の方法（共有結合的および非共有結合的な相互作用を含む）を使用して、ＭＳＲ基部層上に固定化され得る。非共有結合的な相互作用のタイプとしては、例えば、静電的相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、π効果（π－ｅｆｆｅｃｔ）、疎水性相互作用などが挙げられる。一実施形態において、脂質は、ＭＳＲ基部層上に吸着される。別の実施形態において、ＳＬＢは、共有結合的な相互作用を介してＭＳＲ基部層に付着されるかまたはテザーで繋がれる。シリケートに脂質を付着させるための方法は、当該分野で公知である（例えば、表面吸収、物理的固定化、例えば、相変化を使用して、足場材料の中の物質を捕捉する）。一実施形態において、脂質二重層は、ＭＳＲ基部層上に層化される。例えば、脂質フィルム（例えば、クロロホルム中に７７．５：２０：２．５のモル比においてＤＰＰＣ／コレステロール／ＤＳＰＥ－ＰＥＧの溶液を含む）は、メソポーラスシリカ上にスポットされ得、その溶媒は、ロータリーエバポレーターを使用してエバポレートされる。Ｍｅｎｇら，　ＡＣＳ　Ｎａｎｏ，９（４），　３５４０－３５５７，　２０１５を参照のこと。一実施形態において、脂質二重層は、例えば、水和した脂質フィルムを、例えば、約１００ｎｍの孔サイズを有するフィルタを通して、標準的プロトコルを使用して押し出すことによって、調製され得る。次いで、そのフィルタに通された脂質二重層フィルムは、多孔性粒子コアと、例えば、ピペットで混合することによって融合され得る。

【０１１５】

あるいは、アルキル化剤またはアシル化剤を介する共有結合的カップリングは、安定な構造化されかつ長期の、ＭＳＲ層上のＳＬＢの保持を提供するために使用され得る。このような実施形態において、脂質二重層は、公知の技術を使用して、ＭＳＲ層上に可逆的にまたは不可逆的に固定化され得る。例えば、ＭＳＲ基部層は、親水性であり得、より親水性の表面を提供するために、例えば、水酸化アンモニウムおよび過酸化水素でさらに処置され得る。脂質二重層は、例えば、公知のカップリング技術を使用して、多孔性のＭＳＲ基部層上に融合されて、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を形成し得る。その足場は、その構造上に他の二次的薬剤の付着および／または固定化を可能にするために、さらに加工処理されてさらなる部分で誘導体化され得る。

【０１１６】

よって、一実施形態において、本発明は、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供し、ここでそのＳＬＢ構成要素は、リン脂質である。このような脂質の代表例としては、米国特許第９，０６６，８６７号および同第８，３６７６，２８号に記載される両性リポソームが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、脂質二重層は、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、パルミトイル－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）およびジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）またはこれらの組み合わせから選択される脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、脂質二重層は、哺乳動物の細胞膜（例えば、ヒト細胞形質膜）の脂質組成を模倣する脂質組成を含む。多くの哺乳動物細胞膜の脂質組成は、特徴づけられており、当業者によって容易に確認され得る（例えば、Ｅｓｓａｉｄら　Ｂｉｏｃｈｉｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　１８５８（１１）：　２７２５－３６（２０１６）（その内容全体は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。脂質二重層の組成は、脂質二重層の電荷または流動性を改変するために変更され得る。いくつかの実施形態において、脂質二重層は、コレステロールを含む。いくつかの実施形態において、脂質二重層は、スフィンゴ脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質二重層は、リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスホイノシチド、６～２０個の炭素を含む飽和もしくは不飽和のテールを有するホスホスフィンゴ脂質、またはこれらの組み合わせである。

【０１１７】

別の実施形態において、脂質は、ＤＩＹＮＥ　ＰＣ脂質である。このような脂質の代表例としては、１－パルミトイル－２－１０，１２　トリコサジイノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１６：０－２３：２　ＤＩＹＮＥ　ＰＣ）および１，２－ビス（１０，１２－トリコサジイノイル）－ＳＮ－グリセロ－３－ホスホコリン（２３：２　Ｄｉｙｎｅ　ＰＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１８】

一実施形態において、本発明のＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、少なくとも１日間、少なくとも２日間、少なくとも３日間、少なくとも４日間、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少なくとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１３日間、少なくとも１４日間、少なくとも１５日間、少なくとも１６日間、少なくとも１７日間、少なくとも１８日間、少なくとも１９日間、少なくとも２０日間、少なくとも２１日間、少なくとも２５日間、少なくとも３０日間、少なくとも３５日間、少なくとも４０日間、少なくとも５０日間、または５０日間超にわたって、連続流体体系を保持する。

【０１１９】

ＭＳＲ－ＳＬＢ足場の体系は、任意の公知の技術（以下の実施例において例証される顕微鏡による可視化技術が挙げられる）で研究され得る。

【０１２０】

Ｃ．機能的分子

本発明の一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、１種またはこれより多くの機能的分子を含み得る。用語「機能的分子（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」とは、生物学的に所望の特性を有する任意の分子を含む。本発明の状況では、このような機能的分子の例としては、タンパク質、ペプチド、抗原、抗体、ＤＮＡ、ＲＮＡ、炭水化物、ハプテン、および他の低分子、例えば、薬物が挙げられる。一実施形態において、機能的分子は、Ｔ細胞活性化分子である。別の実施形態において、機能的分子は、Ｔ細胞共刺激分子である。さらになお、一実施形態において、機能的分子は、Ｔ細胞ホメオスタシス因子である。ある種の実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、複数の機能的分子、例えば、少なくとも１種のＴ細胞活性化分子、少なくとも１種のＴ細胞共刺激分子、および少なくとも１種のＴ細胞ホメオスタシス因子を含む。

【０１２１】

Ｔ細胞活性化分子

一実施形態において、本発明は、複数のＴ細胞活性化分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。これらの活性化分子は、Ｔ細胞の標的集団の直接的、間接的、または半直接的な活性化を媒介し得る。Ｂｅｎｉｃｈｏｕら，　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，　３（６）：　７５７－７７０，　２０１１を参照のこと。好ましくは、Ｔ細胞活性化分子は、Ｔ細胞の直接的活性化を媒介する。

【０１２２】

一実施形態において、本発明は、Ｔ細胞を、例えば、標的Ｔ細胞上の細胞表面レセプターへの結合を介して直接的に活性化する分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。特に、その直接的活性化は、分化抗原群－３（ＣＤ３）を介して媒介され得、これは、細胞傷害性Ｔ細胞を活性化する助けとなるＴ細胞補助レセプターである。別の実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ３の同時の関与なしに、例えば、ＣＤ３非依存性様式で、直接的に活性化され得る。

【０１２３】

一実施形態において、標的Ｔ細胞は、ＣＤ３依存性様式で活性化される。Ｔ細胞活性化は、ＭＨＣ分子の状況においてそのコグネイトペプチドを認識するためにＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）を要求すると一般的に考えられている。さらに、ＣＤ３とＴＣＲ－ペプチド－ＭＨＣ複合体との会合は、活性化シグナルを細胞内シグナル伝達分子に伝達して、Ｔ細胞においてシグナル伝達カスケードを開始する。Ｒｙａｎら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１０，　７，　２０１０を参照のこと。Ｔ細胞上で見出

されるＣＤ３レセプター複合体は、ＣＤ３γ鎖、ＣＤ３δ鎖、および２本のＣＤ３ε鎖を含み、これらは、ＴＣＲおよびζ鎖（ゼータ鎖；ＣＤ２４７）と会合して、Ｔ細胞において活性化シグナルを生成する。そのＴＣＲ、ζ鎖、およびＣＤ３分子は、Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）複合体を一緒になって構成する。ＴＣＲ複合体のメンバーのうちの１またはこれより多くへの活性化分子の、例えば、抗体の結合は、Ｔ細胞を活性化し得る。

【０１２４】

一実施形態において、Ｔ細胞活性化分子は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。Ｔ細胞活性化分子がＣＤ３依存性様式で作用する場合、そのＴ細胞活性化分子は、好ましくは、抗ＣＤ３抗体またはその抗原結合フラグメントである。別の実施形態において、Ｔ細胞活性化分子としては、例えば、抗ＣＤ２抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＣＤ４７抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗マクロファージスカベンジャーレセプター（ＭＳＲ１）抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）抗体もしくはその抗原結合フラグメントなどが挙げられ得る。別の実施形態において、Ｔ細胞活性化分子は、ＭＨＣペプチドを必要に応じて負荷した主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子またはそのマルチマーである。なおさらに、Ｔ細胞活性化分子は、ＭＨＣおよび免疫グロブリン（Ｉｇ）を含む結合体またはそのマルチマーである。

【０１２５】

用語「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」とは、本明細書で使用される場合、広くは、４個のポリペプチド鎖、２個の重（Ｈ）鎖および２個の軽（Ｌ）鎖から構成される任意の免疫グロブリン（Ｉｇ）分子、またはこれらの任意の機能的フラグメント、変異体、改変体、もしくは誘導体（これらは、Ｉｇ分子の本質的なエピトープ結合特徴を保持する）に言及する。このような変異体、改変体、または誘導体の抗体形式は、当該分野で公知である。その非限定的な実施形態は、本明細書で考察される。一実施形態において、本開示の組成物および方法において使用されるＴ細胞活性化抗体は、ムロモナブ（ＯＫＴ３）、オテリキシズマブ（ＴＲＸ４）、テプリズマブ（ｈＯＫＴ３γ１（Ａｌａ－Ａｌａ））、ビシリズマブ、ＣＤ３抗原／Ｔ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）複合体内のＣＤ３の１７～１９ｋＤε鎖を認識する抗体（ＨＩＴ３ａ）、およびＣＤ３ｅ内のＴＣＲ複合体の２０ｋＤ　サブユニットを認識する抗体（ＵＣＨＴ１）、またはこれらの抗原結合フラグメントからなる群より選択される抗ＣＤ３抗体である。他の抗ＣＤ３抗体（その抗原結合フラグメントを含む）は、米国特許公開番号２０１４－００８８２９５（これは、参考として援用される）に記載される。

【０１２６】

本発明の実施形態は、「全長（ｆｕｌｌ－ｌｅｎｇｔｈ）」抗体を含む。全長抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＨＣＶＲまたはＶＨと略される）および重鎖定常領域から構成される。その重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＬＣＶＲまたはＶＬと略される）および軽鎖定常領域から構成される。その軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬから構成される。ＶＨおよびＶＬ領域は、より保存された領域（フレームワーク領域（ＦＲ）といわれる）の間に配置された超可変性の領域（相補性決定領域（ＣＤＲ）といわれる）へとさらに細かく分けられ得る。各ＶＨおよびＶＬは、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置されている：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスのものであり得る。

【０１２７】

用語抗体の「抗原結合部分（ａｎｔｉｇｅｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｏｒｔｉｏｎ）」（または単に「抗体部分（ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｏｒｔｉｏｎ）」）とは、本明細書で使用される場合、抗原（例えば、ＩＬ－１３）に特異的に結合する能力を保持する抗体の１またはこれより多くのフラグメントに言及する。抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグ

メントによって行われ得ることが、示されてきた。このような抗体の実施形態はまた、二重特異的（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ）、二重特異的（ｄｕａｌ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ）、または多重特異的形式であり得；２種またはこれより多くの異なる抗原に特異的に結合する。用語抗体の「抗原結合部分」内に包含される結合フラグメントの例としては、以下が挙げられる：（ｉ）Ｆａｂフラグメント（ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価フラグメント）；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント（ヒンジ領域におけるジスルフィド結合によって連結された２個のＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント）；（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄフラグメント；（ｉｖ）抗体の１本のアームのＶＬおよびＶＨドメインからなるＦｖフラグメント、（ｖ）単一の可変ドメインを含むｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄら，（１９８９）　Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６，　Ｗｉｎｔｅｒら，　ＰＣＴ公開ＷＯ　９０／０５１４４　Ａ１（本明細書に参考として援用される））；ならびに（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）。さらに、Ｆｖフラグメントの２個のドメイン、ＶＬおよびＶＨは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を使用して、合成リンカー（ＶＬおよびＶＨ領域が対になって、一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知；例えば、Ｂｉｒｄら　（１９８８）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６；およびＨｕｓｔｏｎら　（１９８８）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３を参照のこと）として作製されることを可能にする）によって、繋げられ得る。このような一本鎖抗体はまた、用語抗体の「抗原結合部分」の範囲内に包含されることが意図される。一本鎖抗体の他の形態（例えば、ダイアボディー）もまた、包含される。ダイアボディーは、ＶＨおよびＶＬドメインが一本のポリペプチド鎖上で発現されるが、その同じ鎖上の２つのドメインの間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによって、そのドメインを別の鎖の相補的ドメインと対形成するように強いて、２つの抗原結合部位を作り出す二価の二重特異的抗体である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒら，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８（１９９３）；Ｐｏｌｊａｋら，　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１１２１－１１２３（１９９４）を参照のこと）。このような抗体結合部分は、当該分野で公知である（Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｄｕｂｅｌ編，　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（２００１）　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ．　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ．　７９０　ｐｐ．（ＩＳＢＮ　３－５４０－４１３５４－５）。

【０１２８】

「抗体フラグメント（ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｆｒａｇｍｅｎｔ）」は、無傷の抗体の部分のみを含み、ここでその部分は、好ましくは、無傷の抗体に存在する場合にその部分と通常は関連する機能のうちの少なくとも１つ、および代表的には大部分または全てを保持する。一実施形態において、抗体フラグメントは、無傷の抗体の抗原結合部位を含み、従って、抗原に結合する能力を保持する。別の実施形態において、抗体フラグメント（例えば、Ｆｃ領域を含むもの）は、無傷の抗体に存在する場合にＦｃ領域と通常は関連する生物学的機能のうちの少なくとも１つ（例えば、ＦｃＲｎ結合、抗体半減期調節、ＡＤＣＣ機能および補体結合）を保持する。一実施形態において、抗体フラグメントは、無傷の抗体に実質的に類似のインビボ半減期を有する一価の抗体である。例えば、このような抗体フラグメントは、そのフラグメントにインビボ安定性を付与し得るＦｃ配列に連結された抗原結合アームを含み得る。

【０１２９】

用語「抗体構築物（ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ）」とは、本明細書で使用される場合、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインに連結された１種またはこれより多くの本開示の抗原結合部分を含むポリペプチドに言及する。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によって接続された２個またはこれより多くのアミノ酸残基を含み、１種またはこれより大河の抗原結合部分を連結するために使用される。このようなリンカーポリペプチドは、当該分野で周知である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒら，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８（１

９９３）；Ｐｏｌｊａｋら，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１１２１－１１２３（１９９４）を参照のこと）。免疫グロブリン定常ドメインとは、重鎖または軽鎖の定常ドメインをいう。ヒトＩｇＧ重鎖および軽鎖の定常ドメインアミノ酸配列は、当該分野で公知であり、米国特許第７，９１５，３８８号（その内容全体が、本明細書に参考として援用される）の表２に開示される。

【０１３０】

さらになお、抗体またはその抗原結合部分は、その抗体または抗体部分と１種またはこれより多くの他のタンパク質またはペプチドとの共有結合的会合または非共有結合的会合によって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子の例としては、テトラマーｓｃＦｖ分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖら，Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ６：９３－１０１（１９９５））ならびに二価のビオチン化ｓｃＦｖ分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびＣ末端ポリヒスチジンタグの使用（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖら，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：１０４７－１０５８（１９９４））が挙げられる。抗体部分（例えば、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント）は、従来の技術（例えば、抗体全体のそれぞれ、パパインまたはペプシンでの消化）を使用して、抗体全体から調製され得る。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書で記載されるように、標準的組換えＤＮＡ技術を使用して得られ得る。

【０１３１】

「単離された抗体（ｉｓｏｌａｔｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」とは、本明細書で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体をいうことが意図される（例えば、ＣＤ３に特異的に結合する単離された抗体は、ＣＤ３以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、ＣＤ３に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原（例えば、他の種に由来するＣＤ３分子）に対する交差反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

【０１３２】

用語「ヒト抗体（ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」とは、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本開示のヒト抗体は、例えば、ＣＤＲにおいて、および特に、ＣＤＲ３において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異）を含み得る。しかし、用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、別の哺乳動物種（例えば、マウス）の生殖系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列上にグラフト化された抗体を含むとは意図されない。

【０１３３】

用語「組換えヒト抗体（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」とは、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、作製されるか、または単離される全てのヒト抗体（例えば、宿主細胞へ移入される組換え発現ベクターを使用して発現される抗体（米国特許第７，９１５，３８８号（その内容は、本明細書に参考として援用される）にさらに記載される）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら，ＴＩＢ Ｔｅｃｈ．１５：６２－７０（１９９４）；Ａｚｚａｚｙら，Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３５：４２５－４４５（２００２）；Ｇａｖｉｌｏｎｄｏら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２９：１２８－１４５（２００２）；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ２１：３７１－３７８（２０００））、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Ｔａｙｌｏｒら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２

９５（１９９２）；Ｋｅｌｌｅｒｍａｎｎら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：５９３－５９７（２００２）；Ｌｉｔｔｌｅら，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ２１：３６４－３７０（２００２）を参照のこと）またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の、他のＤＮＡ配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製されるか、発現されるか、作製されるか、または単離される抗体）を含むことが意図される。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかし、ある種の実施形態において、このような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（またはヒトＩｇ配列に関してトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され、従って、その組換え抗体のＶＨ領域およびＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列ＶＨおよびＶＬ配列に由来しかつ関連する一方で、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しなくてもよい配列である。一実施形態は、当該分野で周知の技術（例えば、Ｊｅｒｍｕｔｕｓら，ＰＣＴ公開番号ＷＯ ２００５／００７６９９ Ａ２に開示されるもののようなヒトＩｇファージライブラリーを使用することが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して生成され得るヒトＣＤ３に結合し得る完全ヒト抗体を提供する。

【０１３４】

用語「キメラ抗体（ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」とは、１つの種に由来する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列ならびに別に種に由来する定常領域配列を含む抗体（例えば、ヒト定常領域に連結したマウス重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する抗体）に言及する。キメラ抗体を生成するための方法は、当該分野で公知であり、実施例２．１において詳細に考察される。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓら，（１９８９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２５：１９１－２０２；米国特許第５，８０７，７１５号；同第４，８１６，５６７号；および同第４，８１６，３９７号（これらは、それらの全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと。さらに、「キメラ抗体」は、当該分野で公知の技術によって生成され得る。Ｍｏｒｒｉｓｏｎら，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：８５１－８５５；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８；Ｔａｋｅｄａら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２－４５４（これらは、それら全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０１３５】

用語「特異的結合（ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｂｉｎｄｉｎｇ）」または「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ ｂｉｎｄｉｎｇ）」とは、本明細書で使用される場合、抗体、タンパク質、またはペプチドと、第２の化学種との相互作用に言及して、その相互作用がその化学種上の特定の構造（例えば、抗原性決定基またはエピトープ）の存在に依存する；例えば、抗体が、概してタンパク質に対するのではなく特定のタンパク質構造を認識および結合することを意味する。抗体がエピトープ「Ａ」に対して特異的である場合、標識された「Ａ」およびその抗体を含む反応においてエピトープＡを含む分子（または遊離の非標識Ａ）の存在は、その抗体に結合した標識されたＡの量を低減し得る。

【０１３６】

本発明の足場において使用される抗体は、「単一特異的（ｍｏｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃ）」、「二重特異的（ｂｉ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ）」または「多重特異的（ｍｕｌｔｉｓｐｅｃｉｆｉｃ）」であり得る。本明細書で使用される場合、本明細書中での表現「抗体」とは、単一特異的抗体（例えば、抗ＣＤ３抗体）、ならびに目的の抗原に結合するアーム（例えば、ＣＤ３結合アーム）および第２の標的抗原に結合する第２のアームを含む二重特異的抗体の両方を含むことが意図される。ＣＤ３二重特異的抗体の他のアームが結合するその標的抗原は、細胞、組織、器官、微生物もしくはウイルス（これらに対して標的化された免疫応答が望まれる）上にまたはその付近に発現される任意の抗原であり得る。ある

種の実施形態において、ＣＤ３結合アームは、ヒトＣＤ３に結合し、ヒトＴ細胞増殖を誘導する。ＣＤ３分子の異なる領域に結合する抗体、例えば、ＣＤ３抗原／Ｔ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）複合体内のＣＤ３の１７～１９ｋＤ　ε鎖に結合するアーム（例えば、ＨＩＴ３ａに由来する）、およびＣＤ３ｅ内のＴＣＲ複合体の２０ｋＤａサブユニットに結合するアーム（例えば、ＵＣＨＴ１に由来する）はまた、この用語の意味の範囲内に含まれる。好ましくは、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ３またはそのＣＤ３結合フラグメントである。

【０１３７】

一実施形態において、本発明の足場において使用される抗体分子は、二重特異的抗体である。二重特異的抗体は、本発明の状況において、目的の細胞（例えば、がん細胞または病原体）を本発明の標的エフェクター細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞）と直ぐ近接した状態にするために使用され得、その結果、標的エフェクター細胞のエフェクター機能が目的の細胞に際して特異的に媒介される。従って、一実施形態において、本発明は、二重特異的抗体を含む足場を提供し、ここでその抗体の一方のアームは、ＣＤ３に結合し、他方のアームは、腫瘍関連抗原である標的抗原に結合する。特定の腫瘍関連抗原の非限定的な例としては、以下が挙げられる：例えば、ＡＦＰ、ＡＬＫ、ＢＡＧＥタンパク質、β－カテニン、ｂｒｃ－ａｂｌ、ＢＲＣＡ１、ＢＯＲＩＳ、ＣＡ９、炭酸脱水素酵素ＩＸ、カスパーゼ－８、ＣＣＲ５、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤＫ４、ＣＥＡ、ＣＴＬＡ４、サイクリン－Ｂ１、ＣＹＰ１　Ｂ１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖｌｌｌ、ＥｒｂＢ２／Ｈｅｒ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＥＴＶ６－ＡＭＬ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、Ｆｒａ－１、ＦＯＬＲ１、ＧＡＧＥタンパク質（例えば、ＧＡＧＥ－１、－２）、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧｌｏｂｏＨ、グリピカン－３、ＧＭ３、ｇｐ１００、Ｈｅｒ２、ＨＬＡ／Ｂ－ｒａｆ、ＨＬＡ／ｋ－ｒａｓ、Ｈ　ＬＡ／ＭＡＧ　Ｅ－Ａ３、ｈＴＥＲＴ、ＬＭＰ２、ＭＡＧＥタンパク質（例えば、ＭＡＧＥ－１、－２、－３、－４、－６、および－１２）、ＭＡＲＴ－１、メソテリン、ＭＬ－ＩＡＰ、Ｍｕｄ、Ｍｕｃ２、Ｍｕｃ３、Ｍｕｃ４、Ｍｕｃ５、Ｍｕｃ１６（ＣＡ－１２５）、ＭＵＭ１、ＮＡ１７、ＮＹ－ＢＲ１、ＮＹ－ＢＲ６２、ＮＹ－ＢＲ８５、ＮＹ－ＥＳ０１、ＯＸ４０、ｐ１５、ｐ５３、ＰＡＰ、ＰＡＸ３、ＰＡＸ５、ＰＣＴＡ－１、ＰＬＡＣ１、ＰＲＬＲ、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＭＡ（ＦＯＬＨＩ）、ＲＡＧＥタンパク質、Ｒａｓ、ＲＧＳ５、Ｒｈｏ、ＳＡＲＴ－１、ＳＡＲＴ－３、Ｓｔｅａｐ－１、Ｓｔｅａｐ－２、サバイビン、ＴＡＧ－７２、ＴＧＦ－β、ＴＭＰＲＳＳ２、Ｔｎ、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ、およびウロプラキン－３。

【０１３８】

１つの具体的実施形態において、がん抗原は、上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）ファミリーのメンバー、例えば、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ－１）、ＨＥＲ２／ｃ－ｎｅｕ（ＥｒｂＢ－２）、Ｈｅｒ　３（ＥｒｂＢ－３）および「Ｈｅｒ　４（ＥｒｂＢ－４）、またはこれらの変異体からなる群より選択されるレセプターである。

【０１３９】

別の実施形態において、本発明は、二重特異的Ｔ細胞関与物質（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｅｎｇａｇｅｒ）（ＢｉＴＥ）分子を含む足場に関する。このＢｉＴＥ分子は具体的には、前述の腫瘍抗原のうちの少なくとも１種および少なくとも１種のＴ細胞細胞表面分子（例えば、ＣＤ３）を認識する抗体である。このような二重特異的Ｔ細胞関与物質分子の代表的な例としては、ソリトマブ（ｓｏｌｉｔｏｍａｂ）（ＣＤ３×ＥｐＣＡＭ）、ブリナツモマブ（ＣＤ３×ＣＤ１９）、ＭＡＢ　ＭＴ－１１１（ＣＤ３×ＣＥＡ）、およびＢＡＹ－２０１０１１２（ＣＤ３×ＰＳＭＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４０】

二重特異的抗体はまた、本発明の状況において、エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞またはＢ細胞）を標的化して、病原体（例えば、細菌、ウイルス、真菌、原生生物、および他の微生物）に対する効果を、直接的または間接的いずれかで媒介するために使用され得る。一実施形態において、その病原体は、ウイルスである。別の実施形態において、その

病原体は、細菌である。二重特異的抗体は、細菌感染（例えば、薬物耐性Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）を処置するために使用されてきた。ＤｉＧｉａｎｄｏｍｅｎｉｃｏら，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．，６（２６２），２０１４；Ｋｉｎｇｗｅｌｌら，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．，１４（１）：１５，２０１５を参照のこと。他の二重特異的抗体は、細胞傷害性Ｔリンパ球を再指向して、ＨＩＶを殺滅する（Ｂｅｒｇら，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．，８８（１１）：４７２３－７，１９９１）、ＨＢＶ感染を防御する（Ｐａｒｋら，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３７（１８）：１１２３－３０，２０００）、および他の基本型の病原体を防御する（Ｔａｙｌｏｒら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５９（８）：４０３５－４４，１９９７）ように開発されてきた。

【０１４１】

よって、一実施形態において、本発明は、二重特異的抗体（ここでその抗体の一方のアームは、ＣＤ３に結合し、他方のアームは、感染性疾患と関連する抗原（例えば、細菌、原生動物、ウイルス、または真菌の抗原）である標的抗原に結合する）を含む足場を提供する。感染性疾患と関連する抗原の非限定的な例としては、例えば、ウイルス粒子の表面上で発現されるか、またはウイルスに感染している細胞上で優先的に発現される抗原が挙げられ、ここでそのウイルスは、ＨＩＶ、肝炎ウイルス（Ａ、ＢまたはＣ）、ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－１、ＨＳＶ－２、ＣＭＶ、ＨＡＶ－６、ＶＺＶ、エプスタイン・バーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、ＲＡウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、ＨＴＬＶ、デングウイルス、パピローマウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（ｍｏｌｌｕｓｃｕｍ ｖｉｒｕｓ）、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、ＪＣウイルス、およびアルボウイルス脳炎ウイルス（ａｒｂｏｖｉｒａｌ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）からなる群より選択される。あるいは、標的抗原は、細菌の表面上で発現される、または細菌に感染している細胞上で優先的に発現される抗原であり得、ここでその細菌は、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ、Ｐｎｅｕｍｏｎｏｃｏｃｃｉ、Ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｉ、Ｇｏｎｏｃｏｃｃｉ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｂａｃｉｌｌｉ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、およびＬｅｐｔｏｓｐｉｒａからなる群より選択される属に由来する。いくつかの実施形態において、その細菌は、コレラ、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽、疫病、またはライム病を引き起こす。ある種の実施形態において、標的抗原は、真菌の表面上に発現される、または真菌に感染している細胞上に優先的に発現される抗原であり、ここでその真菌は、Ｃａｎｄｉｄａ（例えば、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ、Ｃ．ｋｒｕｓｅｉ、Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ、Ｃ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓなど）、Ｃｒｙｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ（例えば、Ａ．ｆｕｍｉｇａｔｕｓ、Ａ．ｎｉｇｅｒなど）、Ｍｕｃｏｒａｌｅｓ（例えば、Ｍ．ｍｕｃｏｒ、Ｍ．ａｂｓｉｄｉａ、Ｍ．ｒｈｉｚｏｐｕｓなど）、Ｓｐｏｒｏｔｈｒｉｘ ｓｃｈｅｎｋｉｉ、Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ、Ｐａｒａｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ、Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ、およびＨｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍからなる群より選択される。ある種の実施形態において、標的抗原は、寄生生物の表面上で発現される、または寄生生物に感染している細胞上で優先的に発現される抗原であり、ここでその寄生生物は、Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ、Ｂａｌａｎｔｉｄｉｕｍ ｃｏｌｉ、Ｎａｅｇｌｅｒｉａｆｏｗｌｅｒｉ、Ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａ ｓｐ．、Ｇｉａｒｄｉａ ｌａｍｂｉａ、Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｓｐ．、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｖａｘ、Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｄｏｎｏｖａｎｉ、Ｔｏｘｏｐｌ

ａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ、Ｎｉｐｐｏｓｔｒｏｎｇｙｌｕｓ ｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ、Ｔａｅｎｉａ ｃｒａｓｓｉｃｅｐｓ、およびＢｒｕｇｉａ ｍａｌａｙｉからなる群より選択される。特定の病原体と関連する抗原の非限定的な例としては、例えば、ＨＩＶ ｇｐ１２０、ＨＩＶ ＣＤ４、Ｂ型肝炎糖タンパク質Ｌ、Ｂ型肝炎糖タンパク質Ｍ、Ｂ型肝炎糖タンパク質Ｓ、Ｃ型肝炎Ｅ１、Ｃ型肝炎Ｅ２、肝細胞特異的タンパク質、単純ヘルペスウイルスｇＢ、サイトメガロウイルスｇＢ、およびＨＴＬＶエンベロープタンパク質が挙げられる。

【０１４２】

いくつかの実施形態において、本発明の足場は、アレルギー反応またはアレルギー応答の処置および／または防止のために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、足場は、アレルギー応答またはアレルギー反応を抑制するＴ細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）を生成するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体およびＴＧＦ－βを含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体およびＩＬ－１０を含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体およびラパマイシンを含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体、ＴＧＦ－β、ＩＬ－１０およびラパマイシンを含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体、ＴＧＦ－β、およびＩＬ－１０を含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体およびＴＧＦ－βおよびラパマイシンを含む。いくつかの実施形態において、足場は、抗ＣＤ３抗体およびＩＬ－１０およびラパマイシンを含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態において、本発明の足場は、アレルゲン反応性Ｔ細胞（例えば、Ｔｒｅｇ）を選択的に拡大するために使用され得る。いくつかの実施形態において、足場は、アレルゲンに由来するペプチドを含む。いくつかの実施形態において、アレルゲンに由来するペプチドは、ＭＨＣ分子（例えば、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩの分子）上に（例えば、複合体化して）提示される。いくつかの実施形態において、そのＭＨＣ分子は、モノマーである。いくつかの実施形態において、アレルゲンは、食物アレルゲン（例えば、バナナ、ミルク、マメ科植物、甲殻類、堅果、核果、卵、魚、大豆、または小麦のアレルゲン）である。一実施形態において、アレルゲンは、食物アレルゲン、植物アレルゲン、昆虫アレルゲン、動物アレルゲン、真菌アレルゲン、ウイルスアレルゲン、ラテックスアレルゲン、およびカビ胞子アレルゲンからなる群より選択される。一実施形態において、アレルゲンポリペプチドは、昆虫アレルゲンである。一実施形態において、その昆虫アレルゲンは、チリダニ（ｄｕｓｔ ｍｉｔｅ）アレルゲン（例えば、Ｄｅｒｍａｔｏｐｈａｇｏｉｄｅｓ ｆａｒｉｎａまたはＤｅｒｍａｔｏｐｈａｇｏｉｄｅｓ ｐｔｅｒｏｎｙｓｓｉｎｕｓに由来するアレルゲン）である。一実施形態において、アレルゲンポリペプチドは、オボアルブミンポリペプチドである。一実施形態において、アレルゲンポリペプチドは、食品アレルゲンポリペプチドである。いくつかの実施形態において、足場は、アレルゲンに由来するペプチドおよびＴｈ１非対称性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１２またはＩＦＮγ）を含む。一実施形態において、アレルゲンポリペプチドは、食品アレルゲンポリペプチドである。いくつかの実施形態において、足場は、ＭＨＣ分子上に提示されるアレルゲンに由来するペプチドおよびＴｈ１非対称性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１２またはＩＦＮγ）を含む。ある種の例示的実施形態によれば、本発明は、ＣＤ３およびＣＤ２８に特異的に結合する二重特異的抗原結合分子を含む。このような分子は、例えば、「抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８」，、または「抗ＣＤ３×ＣＤ２８」または「ＣＤ３×ＣＤ２８」二重特異的分子（または他の類似の用語法）として本明細書で言及され得る。

【０１４４】

用語「ＣＤ２８」とは、本明細書で使用される場合、非ヒト種（例えば、「マウスＣＤ２８」、サル「ＣＤ２８」など）に由来していると特定されなければ、ヒトＣＤ２８タンパク質に言及する。ヒトＣＤ２８タンパク質は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＰ＿００１２３０００６．１、ＮＰ＿００１２３０００７．１、またはＮＰ＿００６１３０

．１に示されるアミノ酸配列を有する。マウスＣＤ２８タンパク質は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＰ＿０３１６６８．３に示されるアミノ酸配列を有する。前述のアクセッション番号によって包含される種々のポリペプチド配列は、その対応するｍＲＮＡおよび遺伝子配列を含み、それらの全体において本明細書に参考として援用される。本明細書で使用される場合、表現「抗原結合分子（ａｎｔｉｇｅｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」は、単独で、または１個もしくはこれより多くのさらなるＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域（ＦＲ）と組み合わせて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも１個の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むかまたはこれらからなるタンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。ある種の実施形態において、抗原結合分子は、抗体または抗体のフラグメント（それら用語は本明細書のどこかで定義されるとおり）である。

【０１４５】

本明細書で使用される場合、表現「二重特異的抗原結合分子（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」とは、少なくとも第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインを含む、タンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。その二重特異的抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独で、または１種もしくはこれより多くのさらなるＣＤＲおよび／もしくはＦＲと組み合わせて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも１種のＣＤＲを含む。本発明の状況において、その第１の抗原結合ドメインは、第１の抗原（例えば、ＣＤ３）に特異的に結合し、その第２の抗原結合ドメインは、第２の別個の抗原（例えば、ＣＤ２８）に特異的に結合する。

【０１４６】

二重特異的抗体の第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、互いに直接的にまたは間接的に接続され得る。あるいは、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、別個のマルチマー化ドメインに各々接続され得る。１つのマルチマー化ドメインと別のマルチマー化ドメインとの会合は、２つの抗原結合ドメインの間の会合を促進し、それによって、二重特異的抗原結合分子を形成する。本明細書で使用される場合、「マルチマー化ドメイン（ｍｕｌｔｉｍｅｒｉｚｉｎｇ　ｄｏｍａｉｎ）」とは、同じまたは類似の構造または構成の第２のマルチマー化ドメインと会合する能力を有する、任意の高分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはアミノ酸である。例えば、マルチマー化ドメインは、免疫グロブリンＣＨ３ドメインを含むポリペプチドであり得る。マルチマー化構成要素の非限定的な例は、免疫グロブリンのＦｃ部分（ＣＨ２－ＣＨ３ドメインを含む）、例えば、アイソタイプＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４から選択されるＩｇＧのＦｃドメイン、ならびに各アイソタイプグループ内の任意のアロタイプである。

【０１４７】

本発明の二重特異的抗原結合分子は、代表的には、２個のマルチマー化ドメイン、例えば、別個の抗体重鎖の各個々の一部である２個のＦｃドメインを含む。その第１および第２のマルチマー化ドメインは、同じＩｇＧアイソタイプ（例えば、例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ１、ＩｇＧ２／ＩｇＧ２、ＩｇＧ４／ＩｇＧ４）であり得る。あるいは、その第１および第２のマルチマー化ドメインは、異なるＩｇＧアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、ＩｇＧ１／ＩｇＧ４、ＩｇＧ２／ＩｇＧ４などのような）であり得る。

【０１４８】

ある種の実施形態において、マルチマー化ドメインは、Ｆｃフラグメントまたは少なくとも１個のシステイン残基を含む長さが１～約２００アミノ酸のアミノ酸配列である。他の実施形態において、マルチマー化ドメインは、システイン残基、または短いシステイン含有ペプチドである。他のマルチマー化ドメインとしては、ロイシンジッパー、ヘリックス－ループモチーフ、またはコイルドコイルモチーフを含むかまたはこれらからなる、ペプチドまたはポリペプチドを含む。

【０１４９】

任意の二重特異的抗体の形式または技術は、本発明の二重特異的抗原結合分子を作製するために使用され得る。例えば、第１の抗原結合特異性を有する抗体またはそのフラグメントは、二重特異的抗原結合分子を生成するために、（例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合的会合または別の方法によって）１種またはこれより多くの他の分子実態（例えば、第２の抗原特異性を有する別の抗体または抗体フラグメント）に機能的に連結され得る。本発明の状況において使用され得る具体的な例示的二重特異的形式としては、例えば、ｓｃＦｖベースのまたはダイアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）二重特異的形式、ＩｇＧ－ｓｃＦｖ融合物、二重可変性ドメイン（ＤＶＤ）－Ｉｇ、クアドローマ（Ｑｕａｄｒｏｍａ）、ノブ－イントゥー－ホール（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）、共通軽鎖（例えば、ノブ－イントゥー－ホールとの共通軽鎖など）、ＣｒｏｓｓＭａｂ、ＣｒｏｓｓＦａｂ、（ＳＥＥＤ）ｂｏｄｙ、ロイシンジッパー、Ｄｕｏｂｏｄｙ、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、二重作用Ｆａｂ（ＤＡＦ）－ＩｇＧ、およびＭａｂ２二重特異的形式（前述の形式の総説に関しては例えば、Ｋｌｅｉｎら，ｍＡｂｓ ４：６，１－１１，２０１２およびその中で引用される参考文献を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５０】

多重特異的抗体は、１種の標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってもよいし、１種より多くの標的ポリペプチドに対して特異的な抗原結合ドメインを含んでいてもよい。例えば、Ｔｕｔｔら，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９；Ｋｕｆｅｒら，２００４，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：２３８－２４４を参照のこと。本発明の抗ＣＤ３抗体は、別の機能的分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）に連結され得るかまたは別の機能的分子と共発現され得る。例えば、抗体またはそのフラグメントは第２の結合特異性を有する二重特異的または多重特異的抗体を生成するために、１種またはこれより多くの他の分子実態（例えば、別の抗体または抗体フラグメント）に（例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合的会合または別の方法によって）機能的に連結され得る。抗体の多重特異的抗原結合フラグメントは、代表的には、少なくとも２種の異なる可変ドメインを含み、ここで各可変ドメインは、別個の抗原にまたは同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合し得る。任意の多重特異的抗体形式は、本明細書で開示される例示的な二重特異的抗体形式を含め、本発明の抗体の抗原結合フラグメントの状況において、当該分野で利用可能な慣用的技術を使用して使用するために適合され得る。本発明の多重特異的抗原結合分子は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体に由来する。多重特異的抗体を作製するための方法は、当該分野で周知である。例えば、本発明の二重特異的抗原結合分子の重鎖および／または軽鎖のうちの１種またはこれより多くは、ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ^{TM}技術を使用して調製され得る。ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ^{TM}技術（または任意の他のヒト抗体生成技術）を使用して、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する、特定の抗原（例えば、ＣＤ３またはＣＤ２８）に対する高親和性キメラ抗体は、最初に単離される。その抗体は、特徴づけられ、望ましい特性（親和性、選択性、エピトープなどが挙げられる）に関して選択される。マウス定常領域は、望ましいヒト定常領域で置き換えられて、本発明の二重特異的抗原結合分子へと組みこまれ得る完全ヒト重鎖および／または軽鎖を生成する。

【０１５１】

本発明の二重特異的抗原結合分子の状況において、マルチマー化ドメイン、例えば、Ｆｃドメインは、Ｆｃドメインの野生型の天然に存在するバージョンと比較して、１またはこれより多くのアミノ酸変化（例えば、挿入、欠失または置換）を含み得る。例えば、本発明は、Ｆｃドメインにおいて１またはこれより多くの改変を含む二重特異的抗原結合分子を含み、その改変は、ＦｃとＦｃＲｎとの間に改変された結合相互作用（例えば、増強されるかまたは低下された）を有する改変されたＦｃドメインを生じる。一実施形態において、二重特異的抗原結合分子は、ＣＨ２またはＣＨ３領域に改変を含み、ここでその改変は、酸性環境において（例えば、ｐＨが約５．５～約６．０の範囲に及ぶエンドソーム

の中で）ＦｃＲｎに対するＦｃドメインの親和性を増大させる。非限定的な例は、例えば、米国公開番号２０１４－００８８２９５において提供される。本発明はまた、第１のＣＨ３ドメインおよび第２のＩｇ　ＣＨ３ドメインを含む二重特異的抗原結合分子を含み、ここでその第１のおよび第２のＩｇ　ＣＨ３ドメインは、少なくとも１個のアミノ酸によっては、互いから異なっており、ここで少なくとも１個のアミノ酸の差異は、そのアミノ酸差異を欠く二重特異的抗体と比較して、プロテインＡに対するその二重特異的抗体の結合を低下させる。ある種の実施形態において、Ｆｃドメインは、１種より多くの免疫グロブリンアイソタイプに由来するＦｃ配列を併せ持つキメラであり得る。

【０１５２】

別の実施形態において、Ｔ細胞活性化分子は、ＣＤ３に結合する主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子である。代表的な例としては、ＴＣＲおよびＣＤ８に結合するＭＨＣタイプＩまたはＴＣＲおよびＣＤ４に結合するＭＨＣタイプＩＩが挙げられるが、これらに限定されない。そのＭＨＣ分子は、抗原、例えば、ビオチン化ペプチドが必要に応じて負荷され得る。他の実施形態において、ＭＨＣ分子は、免疫グロブリン、例えば、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）鎖のＦｃ部分に結合体化され得る。別の実施形態において、複数のＭＨＣ－ペプチド複合体が使用され得る。後者の場合では、ＭＨＣ－ペプチド複合体の複数のコピーが、マルチマー化ドメイン（ｍｕｌｔｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｄｏｍａｉｎ）に共有結合的にまたは非共有結合的に付着され得る。このようなＭＨＣマルチマーの公知の例としては、ＭＨＣ－ダイマー（２コピーのＭＨＣ－ペプチドを含む；ＩｇＧは、マルチマー化ドメインとして使用され、ＭＨＣタンパク質のドメインのうちの１つは、ＩｇＧに共有結合される）；ＭＨＣ－テトラマー（４コピーのＭＨＣ－ペプチドを含み、そのうちの各々はビオチン化され、そしてそのＭＨＣ複合体は、ストレプトアビジンモノマーとＭＨＣタンパク質との間に非共有結合的連結を提供して、ストレプトアビジンテトラマータンパク質によって複合体の中で一緒に保持される）；ＭＨＣペンタマー（５コピーのＭＨＣ－ペプチド複合体を含み、自己アセンブリするコイルドコイルドメインによってマルチマー化される）、ＭＨＣデキストラマー（代表的には、デキストランポリマーに付着される１０より多くのＭＨＣ複合体を含む）およびＭＨＣストレプタマー（ストレプトアクチンに付着した８～１２個のＭＨＣ－ペプチド複合体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。ＭＨＣテトラマーは、米国特許第５，６３５，３６３号に記載される；ＭＨＣペンタマーは、米国特許２００４２０９２９５に記載される；ＭＨＣ－デキストラマーは、特許出願ＷＯ　０２／０７２６３１に記載される。ＭＨＣストレプタマーは、Ｋｎａｂｅｌ　Ｍら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　６．　６３１－６３７，　２００２に記載される。

【０１５３】

標的Ｔ細胞はまた、ＣＤ３非依存性様式で、例えば、ＣＤ３以外の１種またはこれより多くの細胞表面レセプターの結合および／または連結を介して活性化され得る。このような細胞表面分子の代表的な例としては、例えば、ＣＤ２、ＣＤ４７、ＣＤ８１、ＭＳＲ１などが挙げられる。

【０１５４】

この状況では、ＣＤ２は、実質的に全てのＴ細胞上に（およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞にも）見出され、そしてＴリンパ球機能において重要である。ＣＤ２は、ＣＤ３、ＣＤ５およびＣＤ４５を含むいくつかのタンパク質と会合される。ＣＤ２－ＣＤ５８相互作用は、Ｔ細胞とＡＰＣとの間の細胞－細胞接触を促進し、それによって、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体を通じて抗原認識を増強する。ＣＤ２はまた、シグナル伝達の役割を果たす。ＣＤ２に対して指向される抗体を使用する共刺激遮断は、臓器移植における強力な免疫抑制ストラテジーであり得る。従って、一実施形態において、そのＴ細胞は、ＣＤ２に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介して活性化される。抗ＣＤ２抗体の代表的な例としては、例えば、シプリズマブ（ＭＥＤＩ－５０７）およびＬＯ－ＣＤ２ｂ（ＡＴＣＣアクセッション番号ＰＴＡ－８０２；１９９９年６月２２日に寄託）が挙げられる。

【０１５５】
ＣＤ４７（ＩＡＰ）は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、膜インテグリンのパートナーであり、そしてまた、リガンドであるトロンボスポンディン－１（ＴＳＰ－１）およびシグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）に結合する。Ｂａｒｃｌａｙら，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１（１）：４７－５２，２００９；Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，１６７（７）：１４１５－３０，２０１２を参照のこと。ＣＤ４７は、シグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）、骨髄系細胞上に存在する阻害性膜貫通レセプターと相互作用する。そのＣＤ４７／ＳＩＲＰα相互作用は、２方向性のシグナル伝達をもたらし、ファゴサイトーシスの阻害、細胞－細胞融合の刺激、およびＴ細胞活性化を含む異なる細胞間応答を生じる。Ｒｅｉｎｈｏｌｄら，ＪＥｘｐ Ｍｅｄ．，１８５（１）：１－１２，１９９７を参照のこと。本発明によれば、一実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ４７に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介して活性化される。抗ＣＤ４７抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体Ｈｕ５Ｆ９－Ｇ４（これは、骨髄性白血病に対して種々の臨床試験において調査中である）、ならびにモノクローナル抗体ＭＡＢＬ－１およびＭＡＢＬ－２（ＦＥＲＭ寄託番号ＢＰ－６１００およびＢＰ－６１０１）が挙げられる。例えば、ＷＯ１９９９／１２９７３（その中の開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０１５６】
ＣＤ８１は、タンパク質のテトラスパニンスーパーファミリーのメンバーである。それは、広い範囲の組織（Ｔ細胞および造血細胞を含む）上で発現される。ＣＤ８１は、免疫調節の役割を果たすことが公知である。特に、ＣＤ８１の交差連結は、αβおよびγδＴリンパ球のＣＤ３媒介性活性化を増強し、インビトロでのγδ Ｔ細胞によるサイトカインのＴＣＲ非依存性生成を誘導する。本発明によれば、一実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ８１に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介して活性化される。Ｍｅｎｎｏら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，４：１２６５，２０１０を参照のこと。抗ＣＤ８１抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体５Ａ６が挙げられる。例えば、Ｍａｅｃｋｅｒら，ＢＭＣ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，４：１，２００３（その中の開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０１５７】
ＭＳＲ１（ＣＤ２０４）は、クラスＡマクロファージスカベンジャーレセプターのファミリーに属し、このファミリーは、ＭＳＲ１遺伝子の選択的スプライシングによって生成される３種の異なるタイプ（１、２、３）を含む。これらレセプターまたはアイソフォームは、トリマーの内在性膜糖タンパク質であり、多くのマクロファージ関連の生理学的および病理学的プロセス（アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、および宿主防御を含む）に関与していた。Ｍａｔｓｕｍｏｔｏら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７（２３）：９１３３－７，１９９０を参照のこと。近年の研究は、樹状細胞（ＤＣ）ＭＳＲ１がＣＤ８ Ｔ細胞の活性化および増殖に影響を与え、ＭＳＲ１の抗体媒介性遮断がインビトロでのＴ細胞の増殖および拡大を増大したことを示す。Ｌｅｒｒｅｔら，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．，７（７）：ｅ４１２４０，２０１２を参照のこと。本発明によれば、一実施形態において、Ｔ細胞は、ＭＳＲ１に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介して活性化される。抗ＭＳＲ１抗体の代表的な例としては、例えば、ラット抗ヒトＣＤ２０４抗体（Ｔｈｅｒｍｏカタログ番号ＭＡ５－１６４９４）およびヤギ抗ヒトＣＤ２０４／ＭＳＲ１抗体（Ｂｉｏｒａｄカタログ番号ＡＨＰ５６３）が挙げられる。

【０１５８】
別の実施形態において、Ｔ細胞は、Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）分子への連結／結合によって活性化され、この分子は、Ｔ細胞において遍在して発現される。ＴＣＲは、２種の異なるタンパク質鎖から構成されるヘテロダイマーである。ヒトでは、Ｔ細胞のうちの９５％において、ＴＣＲは、アルファ（α）鎖およびベータ（β）鎖からなるのに対して、

Ｔ細胞のうちの５％において、ＴＣＲは、ガンマおよびデルタ（γ／δ）鎖からなる。ＴＣＲが、抗原性ペプチドおよびＭＨＣとエンゲージする（ペプチド／ＭＨＣ）場合、Ｔリンパ球は、シグナル伝達を通じて活性化される。本発明によれば、一実施形態において、Ｔ細胞は、ＴＣＲに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介して活性化される。抗ＴＣＲ抗体の代表的な例としては、例えば、マウス抗ヒトＴＣＲモノクローナル抗体ＩＭＭＵ５１０（Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ，　Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，　Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，　ＣＡ）（Ｚｈｏｕら，　Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　９（１）：　３４－４４，　２０１２に記載される）およびアルファ／ベータＴＣＲ　ＷＴ３１を定義するモノクローナル抗体（Ｇｕｐｔａら，　Ｃｅｌｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１３２（１）：２６－４４，　１９９１に記載される）が挙げられる。

【０１５９】

別の実施形態において、Ｔ細胞活性化分子は、ＭＨＣペプチドを必要に応じて負荷した主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子である。ＭＨＣ分子には２つの包括的なクラスがある。クラスＩ　ＭＨＣ（ｐＭＨＣ）分子は、ほぼ全ての細胞上で見出され、ペプチドを細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）に提示する。クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、主に抗原提示免疫細胞（ＡＰＣ）上で見出され、この細胞は、ポリペプチド抗原（例えば、微生物における）を摂取し、それらをペプチドフラグメントへと消化する。次いで、そのＭＨＣ－ＩＩ分子は、ペプチドフラグメントをヘルパーＴ細胞に提示し、それは活性化後、免疫系の他の細胞（例えば、ＣＴＬまたは抗体生成するＢ細胞）の応答のために概して必要とされるヘルパー活性を提供する。ＭＨＣクラスＩ（ｐＭＨＣ）の重鎖の結合溝において結合したペプチドとＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）の相補性決定領域（ＣＤＲ）との間の相互作用は、細胞免疫の求心性および遠心性の段階の間のＴ細胞活性化の可能性を決定する。ＴＣＲとＭＨＣ－ペプチド複合体との間に存在する親和性は、発生、初期活性化、およびエフェクター機能の発揮の間のＴ細胞の結末を決定する。

【０１６０】

よって、一実施形態において、本発明は、ペプチドを必要に応じて負荷したヒトＭＨＣ分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。このようなＭＨＣ分子の代表的な例としては、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＤＰ、ＤＱおよびＤＲ、またはこれらの組み合わせが挙げられる。そのＭＨＣ分子は、一価または二価であり得る。いくつかの実施形態において、ＭＨＣ分子の二価または多価は、Ｔ細胞へのシグナル送達（活性化または阻害いずれかのシグナル）にとって望ましい。従って、いくつかの実施形態において、本発明のＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、リンカーに付着した少なくとも２つの同一のＭＨＣ分子を含む。

【０１６１】

二価ＭＨＣ分子のリンカーは、３つの機能を果たす。第１に、リンカーは、必要とされる二価または多価を与える。第２に、リンカーは、インビボで融合タンパク質全体の半減期を増大させる。第３に、リンカーは、融合タンパク質がＴ細胞を活性化または抑制するか否かを決定する。Ｔ細胞初回刺激は、ＴＣＲを介する刺激およびＡＰＣによって概して送達されるさらなる第２のシグナルを要する。第２のシグナルの非存在下では、Ｔ細胞の低応答性が生じ得る。リンカーが第２のシグナルの送達を可能にする融合タンパク質を構築することによって、Ｔ細胞刺激は、増強されたＴ細胞免疫を生じる。リンカーが第２のシグナルの送達を提供しない融合タンパク質を構築することによって、Ｔ細胞抑制は、免疫抑制を生じる。Ｔ細胞刺激特性を有する融合タンパク質は、ＴＣＲを介して送達されるシグナルに加えてＴ細胞への第２のシグナルの送達を可能にするリンカーを使用することによって構築され得る。これは、別の細胞（その細胞は、Ｔ細胞に第２のシグナルを送達し得る）上の細胞表面構造に対する結合親和性を有するリンカーを使用することによって達成され得る。従って、そのリンカーは、Ｔ細胞および他の細胞を架橋するように働く。Ｔ細胞に直ぐ近接して他の細胞を架橋することによって、他の細胞は、そのＴ細胞に第２のシグナルを送達し得る。

【０１６２】

例としては、他の細胞上のＦｃレセプターに結合し得るリンカー（例えば、ある種の免

疫グロブリン鎖または免疫グロブリン鎖の一部）が挙げられる。具体例としては、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、およびＩｇＭが挙げられる。免疫グロブリンが使用される場合、そのタンパク質全体は必要とされない。例えば、免疫グロブリン遺伝子は、ヒンジ領域において切断され得、その重鎖のヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインをコードする遺伝子のみが、融合タンパク質を形成するために使用される。リンカーは、他の細胞表面構造に結合し得る。例えば、リンカーは、第２の細胞をＴ細胞と直ぐ近接した状態にするために架橋として働き得る多くの細胞表面抗原のためのコグネート部分を含み得る。そのリンカーはまた、第２のシグナルを独立して送達し得る。例えば、Ｔ細胞抗原ＣＤ２８に対して結合親和性を有するリンカーは、第２のシグナルを送達し得る。さらに、そのリンカーは、インビボで融合タンパク質全体の半減期を増大し得る。Ｔ細胞阻害特性を有する融合タンパク質は、第２のシグナルの送達を生じないリンカーを使用することによって構築され得る。例としては、Ｆｃレセプターに結合しないＩｇ鎖、Ｉｇ　Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、ジンクフィインガーモチーフ、ロイシンジッパー、および非生物学的物質が挙げられる。非生物学的物質の例としては、プラスチックマイクロビーズ、またはさらにより大きなプラスチック部材（例えば、プラスチックロッドまたはチューブ）、ならびにインビボで移植医可能な他の生理学的に受容可能なキャリアが挙げられる。

【０１６３】

いくつかの実施形態において、ＭＨＣ分子は、リンカーに付着されない。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、脂質二重層の流体の性質は、Ｔ細胞が膜を認識し、多価クラスターを形成することを可能にすると考えられる。これらのクラスターは、その後分解され得る。これは、シグナル伝達分子がリンカーと一緒に付着される場合には可能でなかった。これらの多価クラスターを分解できないことで、過剰刺激およびＴ細胞消耗またはアネルギーが潜在的にもたらされ得る（例えば、Ｌｅｅ　Ｋ－Ｈら　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３０２（５６４８）：　１２１８－２２（２００３）を参照のこと）。

【０１６４】

いくつかの実施形態において、ＡＰＣ－ＭＳの脂質二重層は、液体秩序ドメイン（ｌｉｑｕｉｄ－ｏｒｄｅｒｅｄ　ｄｏｍａｉｎ）への脂質種の自発的分配を促進する脂質組成物を含む（例えば、Ｗａｎｇ　Ｔ－Ｙら　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４０（４３）：１３０３１－４０（２００１）を参照のこと）。

【０１６５】

必要に応じて、ＭＨＣ分子は、特定のペプチド（例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、またはアレルゲンに由来するペプチド）が負荷され得る。融合タンパク質の特定のペプチドは、融合タンパク質が作製された後に、ＭＨＣ分子へと負荷され得る。ペプチドはまた、その後、例えば、ＵＶ架橋によって、ＭＨＣへと共有結合的に付着され得る。あるいは、ペプチド配列は、そのペプチドが、融合タンパク質の生成の間にＭＨＣ分子へと負荷されるように、融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列へと組みこまれ得る。後者の場合、そのペプチドは、融合タンパク質のＭＨＣ部分と複合体化することを可能にするテザー（例えば、ポリペプチド）で付着され得る。ＭＨＣ分子へと負荷されるべき特定のペプチドは、実質的に無制限であり、そして望ましい適用に基づいて決定される。例えば、Ｔ細胞免疫を増強するために、種々の供給源（例えば、ウイルス、真菌および細菌感染）からの、または腫瘍までのペプチドが、使用され得る。自己免疫ではＴ細胞免疫を抑制するために、自己反応性ペプチドが使用され得る。移植した組織に対するＴ細胞免疫を抑制するために、アロ抗原によって提示される自己ペプチドが使用され得る。

【０１６６】

毒素（例えば、リシンおよびジフテリア毒素）および放射性同位体は、特定のＴ細胞クローンを殺滅するために、融合タンパク質に（例えば、５－メチル－２－イミノチオランを使用して）複合体化され得る。これらの毒素は、リンカーに、または融合タンパク質のＭＨＣ部分に化学的にカップリングされ得るか、またはそれら毒素は、その毒素が融合タンパク質の生成の間に融合タンパク質に複合体化されるように、融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列に組みこまれ得る。

【０１６７】
ＭＨＣ－ペプチド／免疫グロブリン融合タンパク質は、この融合タンパク質の生成をコードする遺伝子を構築することによって調製され得る。あるいは、融合タンパク質の構成要素は、化学的な結合体化方法を使用してアセンブリされ得る。ＭＨＣ分子およびリンカーをコードする遺伝子の供給源は、種々のデータベースから得られ得る。ＭＨＣクラスＩ融合タンパク質の場合には、そのＭＨＣフラグメントは、リンカーに付着され得、β２ミクログロブリンは、自己会合させられ得る。あるいは、融合タンパク質遺伝子は、β２ミクログロブリンがエーテルによってＭＨＣフラグメントに付着されるように構築され得る。ＭＨＣクラスＩＩ融合タンパク質の場合には、α鎖またはβ鎖のいずれかがリンカーに付着され得、その他方の鎖が自己会合させられ得る。あるいは、融合タンパク質遺伝子は、そのα鎖およびβ鎖がテザーによって接続されるように構築され得る。ペプチドは、それらを融合タンパク質遺伝子構築物へコードすることによって、または代わりに、ペプチド合成器で当業者に利用可能な標準的方法論を使用して調製され得る。その得られた完全な融合タンパク質は、慣用的技術を使用して投与され得る。

【０１６８】
Ｔ細胞共刺激分子
一実施形態において、本発明は、複数のＴ細胞共刺激分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。これらの共刺激分子は、Ｔ細胞の標的集団の直接的、間接的、または半直接的な刺激を媒介し得る。好ましくは、その共刺激分子は、１種またはこれより多くのＴ細胞活性化分子の存在下でＴ細胞の活性化を媒介する。

【０１６９】
用語「共刺激分子（ｃｏ－ｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」は、本明細書において、免疫Ｔ細胞活性化においてその分野で認識される意味に従って使用される。具体的には、「共刺激分子」とは、Ｔ細胞と抗原提示細胞との間をエンゲージし、抗原提示細胞上の抗原のＴ細胞レセプター（「ＴＣＲ」）認識から生じるＴ細胞における刺激シグナル（すなわち、「共刺激（ｃｏ－ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ）」）と併せてＴ細胞において刺激シグナルを生成する免疫細胞表面レセプター／リガンドの一群に言及する。本明細書で使用される場合、「ＡＰＣに由来する（ｄｅｒｉｖｅｄ　ｆｒｏｍ　ａｎ　ＡＰＣ）」共刺激分子の可溶性形態とは、Ｂ細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞および他のＡＰＣによって通常発現される共刺激分子に言及する。Ｈｕｐｐａら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．　３，　９７３－９８３（２００３）を参照のこと。「Ｔ細胞活性化の共刺激因子（ｃｏ－ｓｔｉｍｕｌａｔｏｒ　ｏｆ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）」とは、共刺激リガンドが、前述の機構または経路のうちのいずれかを介して、例えば、ＣＤ３依存性またはＣＤ３非依存性のＴ細胞活性化を介して活性化されたＴ細胞に結合し活性化する能力に言及する。共刺激活性化は、周知であるようにサイトカインの生成によって、および周知である増殖アッセイによって（例えば、ＣＦＳＥ染色）および／または以下の実施例で記載されるように、Ｔ細胞に関して測定され得る。

【０１７０】
一実施形態において、本発明は、共刺激抗原に特異的に結合する分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。特に、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、ＣＤ２８、４．１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ２７（ＴＮＦＲＳＦ７）、ＧＩＴＲ（ＣＤ３５７）、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＨＶＥＭ（ＣＤ２７０）、ＬＴβＲ（ＴＮＦＲＳＦ３）、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ１）、ＣＲＴＡＭ（ＣＤ３５５）、ＴＩＭ１（ＨＡＶＣＲ１、ＫＩＭ１）、ＣＤ２（ＬＦＡ２、ＯＸ３４）、ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０、ＳＬＡＭＦ１）、２Ｂ４（ＣＤ２４４、ＳＬＡＭＦ４）、Ｌｙ１０８（ＮＴＢＡ、ＣＤ３５２、ＳＬＡＭＦ６）、ＣＤ８４（ＳＬＡＭＦ５）、Ｌｙ９（ＣＤ２２９、ＳＬＡＭＦ３）、ＣＤ２７９（ＰＤ－１）および／またはＣＲＡＣＣ（ＣＤ３１９、ＢＬＡＭＥ）に特異的に結合する複数のＴ細胞共刺激分子を含む。

【０１７１】

一実施形態において、共刺激分子は、前述の共刺激抗原のうちの１種またはこれより多くに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。この状況では、ＣＤ２８は、基本型のＴ細胞共刺激抗原であり、ＡＰＣ（例えば、樹状細胞および活性化Ｂ細胞）上に発現されるＢ７ファミリーの分子に結合する。ヒトＣＤ２８は、全てのＣＤ４＋Ｔ細胞に、およびＣＤ８＋　Ｔ細胞のうちの約半分に見出される。ＣＤ２８に帰するＴ細胞の作用としては、アネルギーの防止（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ　ｏｆ　ｅｎｅｒｇｙ）、サイトカイン遺伝子転写の誘導、サイトカインｍＲＮＡの安定化およびＣＤ８＋　細胞傷害性Ｔリンパ球の活性化が挙げられる。ＣＤ８０（Ｂ７－１）およびＣＤ８６（Ｂ７－２）として同定されたＣＤ２８のリガンドは、それぞれ、６０ｋｄおよび８０ｋｄの免疫グロブリンスーパーファミリーモノマー膜貫通糖タンパク質である。

【０１７２】

一実施形態において、本発明は、ＣＤ２８に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。抗ＣＤ２８抗体の代表的な例としては、例えば、ルリズマブペゴルおよびＴＧＮ１４１２が挙げられる。米国特許第８，７８５，６０４号もまた参照のこと。

【０１７３】

別の実施形態において、本発明は、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＩＣＯＳは、活性化Ｔ細胞上に発現されるＣＤ２８スーパーファミリー共刺激分子である。それは、Ｔｈ２細胞にとって特に重要であると考えられる。抗ＩＣＯＳ抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体２Ｃ７（これは、活性化Ｔ細胞上で発現されるＩＣＯＳ分子を認識し、抗ヒトＣＤ３モノクローナル抗体によって予め刺激されたＴ細胞の活性化および増殖を誘導する）が挙げられる。Ｄｅｎｇら，　Ｈｙｂｒｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍｉｃｓ．，２３（３）：１７６－８２，　２００４を参照のこと。

【０１７４】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。その抗体は、好ましくは、中和抗体または遮断抗体である。ＣＤ１５２は、活性化ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞上で、ならびに調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）上で発現される。Ｔ細胞生物学において、感染に対する免疫応答の間に、およびがん免疫療法に関する標的としてのその機能は、十分に記載されてきた（Ｅｇｅｎら，　Ｎａｔ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　３（７）：６１１－６１８，　２００２）。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８に相同な対応物であり、これらはともに、ＡＰＣ上のＣＤ８０およびＣＤ８６に結合する。免疫寛容に関するＣＴＬＡ－４の重要性は、明らかである（Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅら，　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２７０（５２３８）：９８５－９８８，　１９９５）。これらは、リガンド結合に関して低親和性ＣＤ２８分子に打ち勝って、Ｔ細胞共刺激を最小限にすること、阻害性ホスファターゼをＴＣＲ複合体へと動員して、正のシグナル伝達カスケードを破壊すること、ならびにＣＤ８０およびＣＤ８６をトランスエンドサイトーシスによってＡＰＣの表面から除去し、それによって、ＡＰＣがＴ細胞を適切に活性化するか別の方法でＴ細胞を応答性にする能力を低減することが挙げられる。よって、ＣＴＬＡ－４レセプター／経路の活用は、Ｔ細胞免疫を調節する魅力的なストラテジーである。実際に、抗ＣＴＬＡ－４は、がん患者におけるチェックポイント遮断処置に関してＦＤＡが承認した最初のモノクローナル抗体（イピリムマブ）であった。本発明に従って使用され得るＣＴＬＡ－４抗体の他の例としては、トレメリムマブおよびその抗原結合フラグメントが挙げられる。

【０１７５】

別の実施形態において、本発明は、プログラムされた死－１（ＰＤ－１；ＣＤ２７９）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。ＰＤ１は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４と同じレセプターファミリーのメンバーであり、リンパ系および骨髄系の細胞上で広く発現される。ＰＤ－１は、ＡＰＣおよび他の周りの組織上のＢ７リガンド、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２に特有に結合し、慢性感染

症の状況において応答しているＣＤ８＋　Ｔ細胞の結末に大きく影響を及ぼす。Ｔ細胞上では、ＰＤ－１は、抗原に遭遇した後に発現されるが、ほぼ直ぐに作用して、ＰＤ－１細胞質テールにおけるシグナル伝達モチーフを通じてホスファターゼＳＨＰ－１およびＳＨＰ－２を動員することによってＴ細胞活性化を妨害し、これは、Ａｋｔリン酸化を低減し、そしてＴ細胞代謝、増殖および生存を減少させる。よって、その抗体は、好ましくは、中和抗体または遮断抗体である。このような抗ＰＤ－１抗体の代表的な例としては、例えば、ニボルマブ、ランブロリズマブ（ＭＫ－３４７５）、ピディリズマブ（ＣＴ－０１１）およびＡＭＰ－２２４が挙げられる。

【０１７６】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ８１に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。ＣＤ８１のエンゲージメントは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞におけるＴ細胞／ＣＤ３媒介性プロウイルスＤＮＡを誘起するために必要とされるシグナル伝達閾値を下げる（Ｔａｒｄｉｆら，　Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．　７９（７）：　４３１６－２８，　２００５）。抗ＣＤ８１抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体５Ａ６が挙げられる。例えば、Ｍａｅｃｋｅｒら，　ＢＭＣ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　４：１，　２００３（その中の開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０１７７】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ１３７の架橋は、Ｔ細胞増殖、ＩＬ－２分泌、生存および細胞溶解活性を増強する。さらに、それは、免役活性を増強して、インビボで腫瘍を排除し得る。よって、ＣＤ１３７に結合する抗体は、好ましくは、アゴニスト的抗体である。抗ＣＤ１３７抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体ウトミルマブ（これは、現在臨床試験において調査されている最中であるヒトＩｇＧである）が挙げられる。Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｔｒｉａｌｓ　ＩＤ：　ＮＣＴ０１３０７２６７を参照のこと。

【０１７８】

別の実施形態において、本発明は、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。ＯＸ４０Ｌは、Ｔ細胞上のＯＸ４０レセプターに結合し、Ｔ細胞が死滅するのを防止し、その後、サイトカイン分泌を増大させる。ＯＸ４０は、その生存を増強する能力に起因して、最初の数日間を過ぎて、かつメモリー応答に進む免疫応答の維持において極めて重要な役割を有する。ＯＸ４０はまた、インビボでＴｈ１媒介性およびＴｈ２媒介性の両方の反応において極めて重要な役割を果たす。よって、ＯＸ４０に結合する抗体は、好ましくは、アゴニスト的抗体である。抗ＯＸ４０抗体の代表的な例としては、例えば、抗ＯＸ４０モノクローナル抗体ウトミルマブ（これは、種々の臨床試験において調査されている最中である）が挙げられる（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｔｒｉａｌｓ　ＩＤ：　ＮＣＴ０１６４４９６８、ＮＣＴ０１３０３７０５およびＮＣＴ０１８６２９００を参照のこと）。

【０１７９】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ２７（ＴＮＦＲＳＦ７）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ２７は、ＴＮＦレセプタースーパーファミリーのメンバーであり、Ｔ細胞免疫の生成および長期間の維持に必要とされる。それは、リガンドＣＤ７０に結合し、免疫グロブリン合成を調節するにあたって重要な役割を果たす。ＣＤ２７は、ＣＤ２８およびＩＬ２の細胞周期促進活性とは無関係に、ナイーブＴ細胞の抗原特異的拡大（しかしエフェクター細胞成熟ではない）を支援する（Ｈｅｎｄｒｉｋｓら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１，　４３３－４４０，　２０００））。よって、本発明のＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、好ましくは、ＣＤ２７に結合するアゴニスト的抗体を含む。抗ＣＤ２７抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体バルリルマブ（ｖａｒｌｉｌｕｍａｂ）が挙げられる。Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａら，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｆｏｒ　ＩｍｍｕｎｏＴｈｅｒａｐｙ　ｏｆ

Ｃａｎｃｅｒ，　３：３７，　２０１５を参照のこと。

【０１８０】

別の実施形態において、本発明は、グルココルチコイド誘導性ＴＮＦレセプターファミリー調節性遺伝子（ＧＩＴＲまたはＣＤ３５７）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＧＩＴＲは、活性化リンパ球上で発現される２５ｋＤ　ＴＮＦレセプタースーパーファミリーのメンバーである。ＧＩＴＲは、Ｔ細胞レセプターエンゲージメントによってアップレギュレートされる。ＧＩＴＲの細胞質ドメインは、ＣＤ４０、４－１ＢＢおよびＣＤ２７に相同である。ＧＩＴＲシグナル伝達は、Ｔ細胞増殖およびＴＣＲ媒介性アポトーシスを調節し、そして免疫学的な自己寛容を破壊することが示された。ＧＩＴＲは、ＧＩＴＲＬにさらに結合し、調節性Ｔ細胞の発生に関与し、Ｔｈ１部分セットの活性を調節する。アゴニスト的抗体でのＧＩＴＲの調節は、複数の機構を介して動物モデルにおいて抗腫瘍免疫応答を増幅することが示された。抗ＧＩＴＲ抗体は、ＧＩＴＲレセプターを活性化するようにデザインされ、それによって、エフェクターＴ細胞の増殖および機能を増大させる。同時に、Ｔｒｅｇの表面上でのＧＩＴＲの連結は、これらの細胞の、腫瘍特異的エフェクターＴ細胞に対する抑制的機能を排除し得、従って、Ｔ細胞免疫応答をさらに増大させる。抗ＧＩＴＲ抗体の代表的な例としては、例えば、ヒト化Ｆｃ無力化（Ｆｃ　ｄｉｓａｂｌｅｄ）抗ヒトＧＩＴＲモノクローナル抗体ＴＲＸ５１８（これは、腫瘍抗原特異的Ｔエフェクター細胞の活性化、および不適切に活性化されたＴ調節性細胞によって誘導される抑制を排除することの両方を誘導する）が挙げられる。ＴＲＸ５１８は、種々の臨床試験において調査されている最中である（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｔｒｉａｌｓ　ＩＤ：　ＮＣＴ０１２３９１３４を参照のこと）。

【０１８１】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ３０抗原は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーに属する膜貫通糖タンパク質であり、これは、刺激された場合、細胞成長および生存に対して多面発現性効果を発揮する。正常のまたは炎症した組織において、ＣＤ３０発現は、中程度／大型の活性化Ｂリンパ球および／またはＴリンパ球に制限される。それは、活性化されたＴ細胞およびＢ細胞によって発現されるが、静止Ｔ細胞およびＢ細胞によっては発現されない（Ｇｕｏら，　Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｉｍｍｕｎ．，　８１（１０），　３９２３－３９３４，　２０１３）。アゴニスト的抗ＣＤ３０モノクローナル抗体（ＭＡｂ）のインビボ投与によるＣＤ３０Ｌ／ＣＤ３０シグナル伝達の刺激は、ＣＤ３０Ｌノックアウトマウスにおいて$V\gamma 1-V\gamma 4-\gamma\delta$　Ｔ細胞によるＩＬ－１７Ａ生成を回復させた。抗ＣＤ３０抗体の代表的な例としては、例えば、ブレンツキシマブベドチン（Ａｄｃｅｔｒｉｓ）が挙げられる。

【０１８２】

別の実施形態において、本発明は、ＨＶＥＭ（ＣＤ２７０）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ２７０は、ＴＮＦレセプタースーパーファミリーのメンバーである。このレセプターは、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）進入の細胞メディエーターとして同定された。この遺伝子における変異は、繰り返して、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫の症例に関連付けられた。抗ＣＤ２７０抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体ＨＶＥＭ－１２２が挙げられる。Ｃｈｅｕｎｇら，　Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１８５：１９４９，　２０１０；Ｈｏｂｏら，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１８９：３９，　２０１２を参照のこと。

【０１８３】

別の実施形態において、本発明は、リンホトキシンβレセプター（ＬＴβＲ；　ＴＮＦＲＳＦ３）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＬＴβＲは、ＣＤ４＋　Ｔ細胞初回刺激に関与する（ＳｕｍｍｅｒｓｄｅＬｕｃａら，　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．，　２０４（５）：１０７１－８１，　２００７）。抗ＬＴβＲ抗体の代表的な例としては、例えば、モノクローナル抗体ＢＢＦ６抗体

が挙げられる。ＷＯ２０１０／０７８５２６（参考として援用される）もまた参照のこと。

【０１８４】

別の実施形態において、本発明は、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＤＲ３は、Ｔ細胞活性化によって誘導されるリンパ球増殖の制御に関与すると考えられる。具体的には、ＤＲ３の活性化は、Ｔ細胞レセプターの事前のエンゲージメントに依存する。ＴＬ１Ａに結合した後に、ＤＲ３シグナル伝達は、ＩＬ－２レセプターを介して内因性ＩＬ－２に対するＴ細胞の感受性を増大させ、Ｔ細胞増殖を増強する。レセプターの活性化は、Ｔ細胞レセプター依存性であるので、ＤＲ３のインビボでの活性は、コグネート抗原に遭遇しているそれらＴ細胞に特異的である。静止時には、および根底に自己免疫のない個体に関しては、コグネート抗原に定期的に遭遇するＴ細胞の大部分は、ＦｏｘＰ３＋　調節性Ｔ細胞である。ＴＮＦＲＳＦ２５の刺激は、いかなる他の外因性シグナルもない場合には、５日間以内に、彼らの全ＣＤ４＋　Ｔ細胞のうちの８～１０％から全ＣＤ４＋　Ｔ細胞のうちの３５～４０％へと、ＦｏｘＰ３＋　調節性Ｔ細胞の顕著なかつ高度に特異性の増殖を刺激する。ＤＲ３アゴニストの代表的な例としては、例えば、ＤＲ３に特異的に結合する抗体（Ｒｅｄｄｙら，　Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．，　８６（１９）　１０６０６－１０６２０，　２０１２）およびアゴニスト４Ｃ１２（Ｗｏｌｆら，　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，　２７；９４（６）：５６９－７４，　２０１２）が挙げられる。

【０１８５】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ１）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ２２６は、ナチュラルキラー細胞、血小板、単球およびＴ細胞の部分セットの表面上に発現される約６５ｋＤａ　糖タンパク質である。それは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、そのリガンド、ＣＤ１１２およびＣＤ１５５を有する他の細胞への細胞接着を媒介する。ＣＤ２２６と抗体との架橋は、細胞活性化を引き起こし、そしてＣＤ２２６およびＬＦＡ－１とそれらそれぞれのリガンドとの連結は、細胞傷害性ならびにＴ細胞およびＮＫ細胞によるサイトカイン分泌を誘発するにあたって協働する（Ｔａｈａｒａら，　Ｉｎｔ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１６（４）：　５３３－８，　２００４）。

【０１８６】

別の実施形態において、本発明は、ＣＲＴＡＭ（ＣＤ３５５）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＴＲＡＭは、ＭＨＣクラスＩ拘束Ｔ細胞関連分子であり、いくらかのＣＤ４＋　Ｔ細胞における細胞極性の後期相を調節する。ＣＴＲＡＭはまた、インターフェロン－γ（ＩＦＮγ）およびインターロイキン－２２（ＩＬ－２２）生成を調節する。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＴＲＡＭ抗体を含む。ＣＴＲＡＭ抗体の代表的な例としては、例えば、マウス抗ヒトＣＴＲＡＭ抗体２１Ａ９（ＧＥＮＴＥＸ　Ｉｎｃ．　ＵＳＡ，　Ｉｒｖｉｎｅ，　ＣＡ）が挙げられる。

【０１８７】

別の実施形態において、本発明は、ＴＩＭ１（ＨＡＶＣＲ１、ＫＩＭ１）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＴＩＭ遺伝子は、タイプＩ細胞表面糖タンパク質に属し、これは、Ｎ末端免疫グロブリン（Ｉｇ）様ドメイン、別個の長さを有するムチンドメイン、単一の膜貫通ドメイン、およびＣ末端の短い細胞質テールを含む。ＴＩＭ遺伝子の位置および機能は、各メンバー間で多様である。ＴＩＭ－１は、Ｔｈ２細胞上で優先的に発現され、Ｔ細胞活性化の刺激分子として同定された（Ｕｍｅｔｓｕら，　Ｎａｔ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　６（５）：　４４７－５４，　２００５）。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＴＩＭ１抗体を含む。ＴＩＭ１抗体の代表的な例としては、例えば、ウサギ抗ヒトＴＩＭ１抗体ａｂ４７６３５（ＡＢＣＡＭ，　Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，　ＭＡ）が挙げられる。

【０１８８】

別の実施形態において、本発明は、ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０、ＳＬＡＭＦ１）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０）は、共刺激分子として機能する自己リガンドおよび細胞表面レセプターであり、そしてマクロファージによるグラム陰性細菌の殺滅を制御した微生物センサでもある。特に、ＳＬＡＭは、細菌外膜タンパク質との相互作用の後に、ＮＡＤＰＨオキシダーゼＮＯＸ２複合体の活性およびファゴソーム進入後のファゴリソソーム成熟を調節した（Ｂｅｒｇｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １１，９２０－９２７，２０１０）。Ｓｌａｍｆ１は、活性化およびメモリーＴ細胞の表面上に、ならびに活性化Ｂ細胞、樹状細胞、マクロファージおよび血小板上に発現される（Ｃａｌｐｅら，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８；９７：１７７）。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＳＬＡＭ１抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＳＬＡＭ１抗体の代表的な例としては、例えば、ウサギ抗ヒトＳＬＡＭ１抗体６００－４０１－ＥＮ３（Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｌｉｍｅｒｉｃｋ，ＰＡ）が挙げられる。

【０１８９】

別の実施形態において、本発明は、２Ｂ４（ＣＤ２４４、ＳＬＡＭＦ４）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ２４４は、非主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）拘束殺滅を媒介するナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）（およびいくつかのＴ細胞）上で発現される細胞表面レセプターである。このレセプターを介するＮＫ細胞と標的細胞との間の相互作用は、ＮＫ細胞の細胞溶解活性を調節すると考えられる。ＣＤ２４４は、選択的ＣＤ２８遮断に伴う免疫調節の存在下での初代抗原特異的ＣＤ８（＋）Ｔ細胞応答を弱める共阻害ＳＬＡＭファミリーメンバーである。近年の研究は、ＣＤ２８シグナル伝達が遮断された動物において抗原特異的ＣＤ８（＋）Ｔ細胞上の２Ｂ４の特異的アップレギュレートを明らかにする（Ｌｉｕら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．２０１４ Ｆｅｂ １０；２１１（２）：２９７－３１１）。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＤ２４４抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ２４４抗体の代表的な例としては、例えば、抗２Ｂ４抗体Ｃ１．７またはＰＥ結合体化抗２Ｂ４（Ｃ１．７）が挙げられ、これら抗体は、Ｓａｎｄｕｓｋｙら（Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６ Ｄｅｃ；３６（１２）：３２６８－７６）において特徴づけられている。

【０１９０】

別の実施形態において、本発明は、Ｌｙ１０８（ＮＴＢＡ、ＣＤ３５２、ＳＬＡＭＦ６）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＳＬＡＭＦ６は、タイプＩ膜貫通タンパク質であり、免疫グロブリンスーパーファミリーのＣＤ２サブファミリーに属し、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔリンパ球、およびＢリンパ球上で発現される。ＳＬＡＭＦ３／ＳＬＡＭＦ６経路を通じたＴリンパ球の共刺激は、標準的なＣＤ２８経路と比較した場合に、ＩＬ－１７Ａ発現に対してより強力な効果を媒介する。ＳＬＡＭＦ３／ＳＬＡＭＦ６シグナル伝達は、増大した核の存在量および近接するＩＬ１７ＡプロモーターへのＲＯＲγｔの動員を媒介し、トランス活性化および遺伝子発現の増大を生じる（Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅら，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，２８７（４５）：３８１６８－３８１７７，２０１２）。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＤ２４４抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ２４４抗体の代表的な例としては、例えば、Ｆｌａｉｇら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４．１７２：６５２４－６５２７）およびＳｔａｒｋら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００５．２９６：１４９－１５８）において特徴づけられた抗ＮＴＢ－Ａ抗体が挙げられる。

【０１９１】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ８４（ＳＬＡＭＦ５）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ８４は、免疫グロブリンレセプタースーパーファミリーのＣＤ２下位グループのメンバーである。この

ファミリーのメンバーは、Ｔ細胞およびＮＫ細胞の活性化にかかわっていた。ＣＤ８４は、活性化Ｔ細胞の増殖応答を増大させ、同種親和性（ｈｏｍｏｐｈｉｌｉｃ）相互作用は、リンパ球におけるインターフェロンγ分泌を増強する。ＣＤ８４はまた、造血前駆体細胞のマーカーとして働き得る。ＰＵＢＭＥＤ　ＩＤ番号１１５６４７８０、１２１１５６４７、１２９２８３９７、１２９６２７２６、１６０３７３９２を有する参考文献中の開示を参照のこと（これらは、長期のＴ細胞：Ｂ細胞接触、最適なＴｈ機能、および胚中心形成に必要とされることを示す）。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＤ８４抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ８４抗体の代表的な例としては、例えば、ＰＥ抗ヒトＣＤ８４抗体ＣＤ８４．１．２１（これは、ＣＤ３誘導性ＩＦＮ－γ生成を増強でき、そしてリンパ球へのＣＤ８４－Ｉｇ結合を部分的に遮断できる）を包含する（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ；カタログ番号３２６００８）。

【０１９２】

別の実施形態において、本発明は、Ｌｙ９（ＣＤ２２９、ＳＬＡＭＦ３）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ２２９は、同種親和性相互作用によってＴリンパ球とアクセサリ細胞との間の接着反応に関する。またそれは、ヘルパーＴ細胞Ｔｈ１７表現型へのＴ細胞分化を促進し、増大したＩＬ－１７分泌をもたらす；共刺激活性は、ＳＨ２Ｄ１Ａを要する（Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅら，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．，　２８７（４５）：　３８１６８－３８１７７，　２０１２）。特に、ＣＤ２２９およびＴＣＲと固定化ＣＤ２２９－Ｈｉｓタンパク質および抗ＣＤ３抗体との同時の連結は、マウスＣＤ３＋脾細胞において用量依存性様式で細胞増殖およびＩＦＮ－γ分泌を有意に増強した（Ｗａｎｇら，　Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，　１８８（ｓｕｐ．　１）　１７６．７，　Ｍａｙ　２０１２）。よって、一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＤ２２９抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ２２９抗体の代表的な例としては、例えば、ＰＥ抗ヒトＣＤ２２９抗体ＨＬｙ－９．１．２５（ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　ＣＡ；カタログ番号３２６１０８）またはマウス抗ヒトＣＤ２２９抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号ＡＦ１８９８）が挙げられる。

【０１９３】

別の実施形態において、本発明は、ＣＤ２７９（ＰＤ－１）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＰＤ－１は、免疫チェックポイントとして機能し、Ｔ細胞の活性化を防止することによって免疫系をダウンレギュレートすることにおいて重要な役割を果たし、これは翻って、自己免疫を低減し、自己寛容を促進する。ＰＤ－１の阻害効果は、調節性Ｔ細胞（サプレッサーＴ細胞）におけるアポトーシスを同時に低減しながら、リンパ節における抗原特異的Ｔ細胞のアポトーシス（プログラムされた細胞死）を促進する二重機構を通じて達成される。ＣＤ２２９抗体の代表的な例としては、例えば、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピディリズマブ（ＣＴ－０１１、Ｃｕｒｅ　Ｔｅｃｈ）、ＢＭＳ９３６５５９、およびアテゾリズマブが挙げられる。

【０１９４】

別の実施形態において、本発明は、ＣＲＡＣＣ（ＣＤ３１９、ＢＬＡＭＥ）に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。ＣＤ３１９は、ＳＨ２Ｄ１Ａ非依存性細胞外シグナル調節性ＥＲＫ媒介性経路を通じてＮＫ細胞活性化を媒介する（Ｂｏｕｃｈｏｎら，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２００１　Ｎｏｖ　１５；１６７（１０）：５５１７－２１）。ＣＤ３１９はまた、ＮＫ細胞機能を正方向に調節し、ＮＫ細胞の活性化に寄与し得る。よって、一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、モノクローナル抗ＣＤ３１９抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ３１９抗体の代表的な例としては、例えば、エロツズマブまたはその抗原結合フラグメントが挙げられる。

【０１９５】

ある種の実施形態において、本発明は、少なくとも１種のＴ細胞活性化分子および少なくとも１種のＴ細胞共刺激分子を含む結合対を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。このような対の代表的な例としては、例えば、ＣＤ３／ＣＤ２８、ＣＤ３／ＩＣＯＳ、ＣＤ３／ＣＤ２７、およびＣＤ３／ＣＤ１３７に結合する抗体、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。この状況では、共刺激分子の活性の所望の調節に依存して、第１の構成要素（ＣＤ３）に関するアゴニスト抗体および第２の構成要素に関するアゴニスト抗体またはアンタゴニスト抗体を使用することが望ましいことであり得る。

【０１９６】

ある種の実施形態において、本発明は、ＣＤ３に結合する抗体である少なくとも１種のＴ細胞活性化分子およびＣＤ２８に結合する抗体である少なくとも１種のＴ細胞共刺激分子を含む結合対を、必要に応じてＩＣＯＳ、ＣＤ２７、およびＣＤ１３７からなる群より選択される抗原に結合する抗体である第２の共刺激分子と一緒に含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、以下の組み合わせから選択される機能的分子の組み合わせを含む：（ａ）ＣＤ３、ＣＤ２８およびＩＣＯＳに結合する抗体、（ｂ）ＣＤ３、ＣＤ２８およびＣＤ２７に結合する抗体、（ｃ）ＣＤ３、ＣＤ２８およびＣＤ１３７に結合する抗体、（ｄ）ＣＤ３、ＣＤ２８、ＩＣＯＳおよびＣＤ２７に結合する抗体。この点に関して、実験データは、これらの二次Ｔ細胞共刺激因子の刺激は、適切な活性化刺激（例えば、ＣＤ３＋ＣＤ２８）とともに適用される場合、Ｔ細胞にある種のタイプの分化を刺激し得ることを示唆する。例えば、ＩＣＯＳ刺激は、ＣＤ３＋ＣＤ２８＋刺激と協働する場合、Ｔｈエフェクター細胞の分化を促進するのに対して、それは、共刺激シグナルが不十分である場合には、調節性Ｔ細胞の分化を支援する。Ｍｅｓｔｕｒｉｎｉら，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３６（１０）：２６０１－１２，２００６を参照のこと。同様に、抗ＣＤ２７抗体は、そのシステムを微細に調節するために使用され得る。この状況では、抗ＣＤ２７抗体１Ｆ５は（抗ＣＤ３抗体とともに使用される場合）、潜在的に危険なポリクローナルＴ細胞活性化－共刺激ＣＤ２８特異的スーパーアゴニスト的抗体で観察された現象を誘発しなかった。Ｔｈｏｍａｓら，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，３：ｅ２７２５５，２０１４を参照のこと。

【０１９７】

一実施形態において、その結合対は、単一特異的抗体であって、ここで第１の抗体はその対の第１のメンバー（例えば、ＣＤ３）に結合し、第２の抗体は、その対の第２のメンバー（例えば、ＣＤ２８）に結合するものを含む。別の実施形態において、その対は、二重特異的抗体であって、ここで単一の抗体は、個々の対のメンバーに結合するもの（例えば、ＣＤ３およびＣＤ２８に結合する二重特異的抗体）を含む。この状況では、二重特異的抗体は、増強されたＴ細胞活性化を付与するそれらの能力に起因して好ましい。Ｗｉｌｌｅｍｓら，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５ Ｎｏｖ；５４（１１）：１０５９－７１を参照のこと。

【０１９８】

あるいは、その結合対は、単一特異的抗体であって、ここで第１の抗体はＣＤ３に結合し、第２の抗体は、ＩＣＯＳに結合するものを含む。ＩＣＯＳに結合する抗体の状況では、その分子が移植片対宿主病の病因に関わっている限りにおいて（Ｓａｔｏら，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，９６（１）：３４－４１，２０１３を参照のこと）、ＩＣＯＳを中和するアンタゴニスト的抗体を使用することは、好ましいことであり得る。アゴニストＣＤ３結合抗体フラグメントおよびアンタゴニストＩＣＯＳ結合抗体フラグメントを含む二重特異的抗体はまた、使用され得る。

【０１９９】

あるいは、その結合対は、単一特異的抗体であって、ここで第１の抗体は、ＣＤ３に結合し、第２の抗体は、ＣＤ２７に結合するものを含む。この実施形態において、両方の抗体は、好ましくは、刺激抗体またはアゴニスト抗体である。ＣＤ２７共刺激は、インビボで再指向されたヒトＴ細胞の生存および抗腫瘍活性を高めることが報告されている（Ｓｏｎｇら，Ｂｌｏｏｄ，１１９（３）：６９６－７０６，２０１２）。アゴニストＣ

Ｄ３結合抗体フラグメントおよびアゴニストＣＤ２７結合抗体フラグメントを含む二重特異的抗体はまた、使用され得る。

【０２００】

あるいは、その結合対は、単一特異的抗体であって、ここで第１の抗体は、ＣＤ３に結合し、第２の抗体は、ＣＤ１３７に結合するものを含む。この実施形態において、両方の抗体は、好ましくは、刺激抗体またはアゴニスト抗体である。ＣＤ１３７共刺激は、養子Ｔ細胞療法のためのＣＤ８（＋）　黒色腫腫瘍浸潤リンパ球の拡大および機能を改善することが報告されている（Ｃｈａｃｏｎら，　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．　２０１３；８（４）：ｅ６００３１，　２０１３）。アゴニストＣＤ３結合抗体フラグメントおよびアゴニストＣＤ２７結合抗体フラグメントを含む二重特異的抗体また、使用され得る。

【０２０１】

Ｔ細胞ホメオスタシス因子

一実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、およびトランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、またはこれらのアゴニスト、これらの模倣物、これらの改変体、これらの機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるホメオスタシス因子を含む。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、およびトランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、またはこれらのアゴニスト、これらの模倣物、これらの改変体、これらの機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される複数のホメオスタシス因子を含む。これらのホメオスタシス因子の機能的フラグメント（これは、標的細胞の活性を調節するそれらの能力によって特徴づけられる）はまた、使用され得る。ホメオスタシス因子の代表的なタイプ（ヒトのおよび／またはこれらのマウスホモログのＮＣＢＩアクセッション番号を含む）は、表１に提供される。

【表１－１】

表1. 足場において使用され得るT細胞ホメオスタシス因子のタイプ

T細胞ホメオスタシス因子	NCBI アクセッション番号
IL-1 (IL-1α)	NP_000566.3 (ヒト) NP_034684.2 (マウス)
	NP_000567.1 (ヒト)

【表１－２】

IL-1 (IL-1β)	NP_032387.1 (マウス)
IL-2	NP_000577.2 (ヒト) NP_032392.1 (マウス)
IL-4	NP_000580.1; NP_758858.1 (ヒト) NP_067258.1 (マウス)
IL-5	NP_000870.1 (ヒト) NP_034688.1 (マウス)
IL-7	NP_000871.1; NP_001186815.1; NP_001186816.1; NP_001186817.1 (ヒト) NP_032397.1 (マウス)
IL 10	NP_000563.1 (ヒト) NP_034678.1 (マウス)
IL 12A	NP_000873.2 (ヒト) NP_001152896.1; NP_032377.1 (マウス)
IL-12B	NP_002178.2 (ヒト) NP_001290173.1 (マウス)
IL-15	NP_000576.1; NP_751915.1 (ヒト) NP_001241676.1; NP_032383.1 (マウス)
IL-17 (A)	NP_002181.1; NP_034682.1 (ヒト) NP_002181.1; NP_034682.1 (マウス)
TGFβ 1	NP_000651.3 (ヒト) NP_035707.1 (マウス)
TGFβ 2	NP_001129071.1; NP_003229.1 (ヒト) NP_033393.2 (マウス)
TGFβ 3	NP_003230.1 (ヒト)

【０２０２】

前述のＴ細胞ホメオスタシス因子のフラグメントおよび改変体は、当該分野で公知である。例えば、前述のホメオスタシス因子の各々のＵＮＩＰＲＯＴデータベース登録は、その改変体と野生型生体マーカーとの間の構造的関連性を含め、「天然の改変体」を列挙する。純粋に代表として、ヒトＩＬ－１βタンパク質（ＵＮＩＰＲＯＴ：　Ｐ０１５８４）は、推定ヒトＩＬ－１βタンパク質配列のアミノ酸残基１４１においてＥ→Ｎアミノ酸置

換を有する天然の改変体（ＶＡＲ＿０７３９５１）を含む。フラグメントは、公知であれば、この節の下に同様に列挙される。

【０２０３】

好ましくは、Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはそのアゴニスト、その模倣物、その改変体、その機能的フラグメント、またはこれらの、表１に列挙される１種またはこれより多くのＴ細胞ホメオスタシス因子との組み合わせである。ＩＬ－２アゴニストの例としては、例えば、ＢＡＹ　５０－４７９８（Ｍａｒｇｏｌｉｎら，　Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　２００７　Ｊｕｎ　１；１３（１１）：３３１２－９）が挙げられる。ＩＬ－２模倣物の例としては、例えば、ペプチド１－３０（Ｐ１－３０）が挙げられ、これは、ＩＬ－２と相乗効果的に作用する（Ｅｃｋｅｎｂｅｒｇら，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２０００；　１６５：４３１２－４３１８）。ＩＬ－２フラグメントの例としては、例えば、ＩＬ－２の最初の１００アミノ酸を含むバラスト部分（ｂａｌｌａｓｔ　ｐｏｒｔｉｏｎ）が挙げられる（米国特許第５，４９６，９２４号を参照のこと）。ＩＬ－２改変体の例としては、例えば、天然の改変体ＶＡＲ＿００３９６７および天然の改変体ＶＡＲ＿００３９６８が挙げられる。ＩＬ－２を含む融合タンパク質、例えば、Ｆ１６－ＩＬ２もまた含まれ、これは、短い５アミノ酸リンカーを介して、ヒトＩＬ－２の組換え形態に融合されているテネイシン－Ｃのエクストラドメイン Ａ１に対するｓｃＦｖである。Ｆ１６－ＩＬ２融合タンパク質のモノクローナル抗体部分は、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）テネイシン－Ｃを発現する腫瘍細胞に結合する。翻って、その融合タンパク質のＩＬ－２部分は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージおよび好中球を刺激し、Ｔ細胞抗腫瘍細胞性免疫応答を誘導する。本発明に従って使用され得る他のＩＬ－２模倣物としては、例えば、ＩＬ－２スーパーカインペプチド（Ｌｅｖｉｎら，　Ｎａｔｕｒｅ　４８４，　５２９－５３３，　２０１２）、およびＩＬ－２部分アゴニストペプチド（Ｚｕｒａｗｓｋｉら，　ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ，　９（１２）：３８９９－３９０５，　１９９０および米国特許第６，９５５，８０７号）、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【０２０４】

本発明の実施形態は、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場（このような足場から作製されたＡＰＣ－ＭＳ足場を含む）をさらに含み、その足場は、複数の前述のＴ細胞ホメオスタシス因子をさらに含む。従って、一実施形態において、本発明は、ＩＬ－２である第１のＴ細胞ホメオスタシス因子およびＩＬ－７、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５、またはＩＬ－１５スーパーアゴニストである第２のＴ細胞ホメオスタシス因子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場を提供する。この状況では、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＩＬ－１５　ＳＡ）は、ＩＬ－１５と可溶性ＩＬ－１５レセプター－αとの組み合わせであり、これは、ＩＬ－１５単独より大きな生物学的活性を有する。ＩＬ－１５　ＳＡは、ＮＫおよびメモリーＣＤ８＋　Ｔ（ｍＣＤ８＋　Ｔ）リンパ球を選択的に拡大するその能力から、魅力的な抗腫瘍および抗ウイルス薬剤と考えられる。Ｇｕｏら，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２０１５　Ｓｅｐ　１；１９５（５）：２３５３－６４を参照のこと。

【０２０５】

本発明の実施形態はさらに、複数のＴ細胞刺激分子、Ｔ細胞共刺激分子およびＴ細胞ホメオスタシス因子を含む足場に関する。代表的な足場は、前述のＴ細胞刺激分子、Ｔ細胞共刺激分子およびＴ細胞ホメオスタシス因子の各々のうちの少なくとも２種、少なくとも３種、少なくとも４種、少なくとも５種、少なくとも６種、少なくとも７種、少なくとも８種、少なくとも９種、少なくとも１０種、少なくとも１１種、または１１種超を含み得る。

【０２０６】

本発明の足場では、任意の機能的分子、例えば、抗原、抗体、タンパク質、酵素（これらのフラグメントを含む）は、慣用的な技術を使用して、ＭＳＲ基部層および／またはＳＬＢ上に直接的または間接的に固定化され得る。ある種の実施形態において、その機能的分子は、オルガネラ（例えば、ゴルジ膜または形質膜）、細胞、細胞クラスター、組織、

微生物、動物、植物、またはこれらの抽出物の中で提供され得、これは、翻って、ＭＳＲ層またはＳＬＢ層上に固定化される。機能的分子はまた、所望の位置（例えば、ＳＬＢ層の外面）での遺伝子操作または化学反応によって合成され得る。

【０２０７】

本明細書で記載される足場は、シグナル伝達分子、例えば、Ｔ細胞ホメオスタシス因子を含み、放出して、機能的Ｔ細胞応答を誘発する。一実施形態において、その放出されたＴ細胞ホメオスタシス因子は、内因性の供給源から単離されるか、またはインビボもしくはインビトロで合成されるポリペプチドである。例えば、内因性ＩＬ－２ポリペプチドは、健康なヒト組織から単離され得る。あるいは、合成機能的分子は、宿主生物または細胞（例えば、培養したヒト細胞株または哺乳動物（例えば、ヒト化マウスまたはウサギ））へのテンプレートＤＮＡのトランスフェクションまたは形質転換を介して合成され得る。あるいは、タンパク質形態にある合成機能的分子は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）または他の当該分野で認識される方法によって、インビトロで合成され得る（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｖｏｌ．１，２，３（１９８９）（本明細書に参考として援用される））。

【０２０８】

機能的分子は、インビボでのタンパク質安定性を増大させるために改変され得る。あるいは、機能的分子は、多かれ少なかれ免疫原性であるように操作される。例えば、種々の機能的分子の構造が公知である限りにおいて、その配列は、免疫原性改変体を生成するために、アミノ酸残基のうちの１またはこれより多くにおいて、例えば、グリコシル化部位において、改変され得る。

【０２０９】

一実施形態において、機能的分子は、組換えである。あるいは、機能的分子は、哺乳動物対応物のヒト化誘導体である。機能的分子が由来する例示的な哺乳動物種としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、フェレット、ネコ、イヌ、サルまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、機能的分子は、前述の機能的分子のヒトまたはヒト化バージョンである。

【０２１０】

前述の機能的分子、例えば、Ｔ細胞刺激分子、Ｔ細胞共刺激分子およびＴ細胞ホメオスタシス因子の各々は、互いから独立して、ＭＳＲ基部層またはＳＬＢ基部層に吸着または組み込まれ得る。従って、一実施形態において、Ｔ細胞刺激分子がＭＳＲ基部層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。好ましくは、Ｔ細胞刺激分子がＳＬＢ層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。別の実施形態において、Ｔ細胞刺激分子がＭＳＲ基部層およびＳＬＢ層の両方に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。別の実施形態において、Ｔ細胞共刺激分子がＭＳＲ基部層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。好ましくは、Ｔ細胞共刺激分子がＳＬＢ層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。さらに別の実施形態において、Ｔ細胞共刺激分子がＭＳＲ基部層およびＳＬＢ層の両方に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。別の実施形態において、Ｔ細胞ホメオスタシス因子がＭＳＲ基部層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。別の実施形態において、Ｔ細胞ホメオスタシス因子がＳＬＢ層に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。さらに別の実施形態において、Ｔ細胞ホメオスタシス因子がＭＳＲ基部層およびＳＬＢ層の両方に吸着または組み込まれたＡＰＣ－ＭＳが提供される。

【０２１１】

一般に、機能的分子ならびにＭＳＲ基部層および／またはＳＬＢ層は、反応性基の使用を通じて一緒に連結され得、それらは代表的には、新たな有機性官能基または非反応性種へと連結プロセスによって変換される。その反応性官能基は、前述の構成要素のうちのいずれかに位置し得る。本発明の実施において有用な反応性基および反応のクラスは、一般

に、バイオコンジュゲーションケミストリーの分野において周知であるものである。反応性キレート化合物で利用可能な反応の現在都合の良いクラスは、比較的穏やかな条件下で進行するものである。これらとしては、求核性置換（例えば、アミンおよびアルコールとアシルハライド、活性エステルとの反応）、求電子性置換（例えば、エナミン反応）、ならびに炭素－炭素および炭素－ヘテロ原子多重結合への付加（例えば、マイケル反応、ディールス－アルダー付加）が挙げられるが、これらに限定されない。これらおよび他の有用な反応は、例えば、Ｍａｒｃｈ，　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，　第３版，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　１９８５；　Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，　１９９６；およびＦｅｅｎｅｙら，　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ；　ｖｏｌ．　１９８，　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，　Ｄ．Ｃ．，　１９８２において考察される。

【０２１２】

有用な反応性ペンダント官能基としては、例えば、以下が挙げられる：

（ａ）カルボキシル基およびその種々の誘導体（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、酸ハライド（例えば、Ｉ、Ｂｒ、Ｃｌ）、アシルイミダゾール、チオエステル、ｐ－ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルが挙げられるが、これらに限定されない）；

（ｂ）ヒドロキシル基（これは、例えば、エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換され得る）

（ｃ）ハロアルキル基（ここでそのハライドは、求核性基（例えば、アミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンのような）と後に置換され得、それによって、ハロゲン原子の官能基において新たな基の共有結合的付着を生じる）；

（ｄ）ジエノフィル基（これは、ディールス－アルダー反応に関与し得る（例えば、マレイミド基のような））；

（ｅ）アルデヒドまたはケトン基（その後の誘導体化は、カルボニル誘導体（例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシムのような）の形成を介して、またはグリニャール付加もしくはアルキルリチウム付加のような機構を介して可能である）；

（ｆ）アミンとその後反応して、例えば、スルホンアミドを形成するためのスルホニルハライド基；

（ｇ）チオール基（これは、例えば、ジスルフィドに変換され得るか、またはアシルハライドと反応させられ得る）；

（ｈ）アミンまたはスルフヒドリル基（これらは、例えば、アシル化される得るか、アルキル化され得るか、またはオキシド化され得る）；

（ｉ）アルケン（これは、例えば、環化付加、アシル化、マイケル付加などを受け得る）；

（ｊ）エポキシド（これは、例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応し得る）；ならびに

（ｋ）核酸合成において有用なホスホロアミダイトおよび他の標準的官能基。

【０２１３】

反応性官能基は、反応性キレート化合物をアセンブリするために必要な反応に関与しないか、または干渉しないように、選択され得る。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在によって反応に関与することから保護され得る。当業者は、特定の官能基が選択された反応条件のセットに干渉しないように、その特定の官能基をどのように保護するかを理解する。例えば、Ｇｒｅｅｎｅら，　Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　１９９１を参照のこと。

【０２１４】

一実施形態において、機能的分子は、親和性ペアリングまたは化学的カップリングを介して、ＭＳＲ基部層もしくはＳＬＢ、またはＭＳＲ層およびＳＬＢの両方に負荷／吸着される。

【０２１５】

用語「親和性の対（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｐａｉｒ）」とは、本明細書で使用される場合、抗原－抗体、レセプター－ホルモン、レセプター－リガンド、アゴニスト－アンタゴニスト、レクチン－炭水化物、核酸（ＲＮＡもしくはＤＮＡ）のハイブリダイズする配列、ＦｃレセプターもしくはマウスｌｇＧ－プロテインＡ、アビジン－ビオチン、ストレプトアビジン－ビオチン、ビオチン／ビオチン結合薬剤、Ni^{2+}またはCu^{2+}／Ｈｉｓタグ（６×ヒスチジン）およびウイルス－レセプター相互作用を含む。種々の他の特異的結合対は、本発明の方法を実施することにおける使用に関して企図される。

【０２１６】

本明細書で使用される場合、「ビオチン結合薬剤（ｂｉｏｔｉｎ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）」とは、アビジン、ストレプトアビジンおよび他のアビジンアナログ（例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン結合体、アビジンまたはストレプトアビジンの高度に精製され、かつ分画された種、ならびに非アミノ酸改変体または部分的アミノ酸改変体、ビオチン結合になお適合するアミノ酸置換もしくは化学的置換を有する組換えまたは化学合成されたアビジンアナログを包含する。好ましくは、各ビオチン結合薬剤分子は、少なくとも２つのビオチン部分、およびより好ましくは少なくとも４つのビオチン部分を結合する。本明細書で使用される場合、「ビオチン」は、ビオチンに加えて、ビオシチンおよび他のビオチンアナログ（例えば、ビオチンアミノカプロエートＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビオチン４－アミド安息香酸、ビオチンアミドカプロイルヒドラジドならびに他のビオチン誘導体および結合体）を包含する。他の誘導体としては、ビオチン－デキストラン、ビオチン－ジスルフィド－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビオチン－６　アミドキノリン、ビオチンヒドラジド、ｄ－ビオチン－Ｎ　ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビオチンマレイミド、ｄ－ビオチンｐ－ニトロフェニルエステル、ビオチン化ヌクレオチドおよびビオチン化アミノ酸（例えば、Ｎε－ビオチニル－１－リジン）が挙げられる。

【０２１７】

親和性対形成を介して官能化され得るリガンドとしては、天然または合成の供給源から調製または単離される、レセプター、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、ウイルス、化学療法剤、レセプターアゴニストおよびアンタゴニスト、抗体フラグメント、レクチン、アルブミン、ペプチド、プロテイン、ホルモン、アミノ糖、脂質、脂肪酸、核酸および細胞が挙げられるが、これらに限定されない。簡潔には、本発明の実施を通じて検出されるべき任意の分子エピトープまたはレセプターの任意の部位特異的リガンドが、利用され得る。好ましくは、そのリガンドは、膜結合タンパク質（ｍｅｍｂｒａｎｅ－ａｎｃｈｏｒｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）である。そのリガンドはまた、膜結合タンパク質の誘導体（たとえば、可溶性細胞外ドメイン）であり得る。リガンドは、レセプター－レセプター細胞相互作用（例えば、ＭＨＣレセプターへのＴＣＲ結合）に関与するレセプターであり得る。

【０２１８】

本発明のリガンドは、当該分野で公知の任意の方法によって発現および精製され得る。ある種の実施形態において、そのタンパク質は、バキュロウイルスベースの昆虫発現系または哺乳動物発現系によって発現される。ＡＶＩＴＡＧ^{TM}ペプチドの１５個の残基は、その分子の全てのＣ末端に付加され得る。ＡＶＩＴＡＧ^{TM}（Ａｖｉｄｉｔｙ，　ＣＯ）におけるリジン残基は、ＢｉｒＡ酵素（Ａｖｉｄｉｔｙ，　ＣＯ）によって特異的にビオチン化され得る。そのタンパク質はまた、細胞培養物の上清へと分泌されるようにデザインされ得る。

【０２１９】

機能的分子は、本明細書中上記で特に言及されるように、任意のタンパク質またはペプ

チドであり得る。好ましくは、そのタンパク質は、リガンド－レセプター相互作用に関与する。例えば、Ｔ細胞活性化の重要な事象は、Ｔ細胞とＡＰＣとの間の膜－膜接触の結果であり、ここで種々のリガンド－レセプター相互作用が、２種の対向する膜（ＭＨＣ－ペプチドおよびＴＣＲ、ＬＦＡ－１およびＩＣＡＭ－１、ＣＤ２およびＣＤ４８、ならびにＢ７またはＣＴＬＡ－４およびＣＤ２８が挙げられる）の間で起こる。これらの相互作用の結合価要件を理解すれば、ある種の抗原に対する免疫応答を増強または阻害する治療剤のデザインが促進される。本発明はまた、アゴニストおよびアンタゴニスト抗原によって誘導されるＴ細胞細胞内シグナル伝達経路における微妙な差異を研究するツールとして使用され得る。その足場は、生化学的分析をしばしば複雑にする天然の抗原提示細胞を使用することなく、微妙な差異を試験する間違いの少ない生理学的状況を提供する。

【０２２０】

ストレプトアビジン－ビオチン相互作用は、本明細書および実施例全体を通じて例証されると同時に、本明細書中上記で記載されるとおりの特異的結合対メンバーは、本発明の方法においてストレプトアビジンおよびビオチンの代わりに使用され得る。さらに、特異的結合対のうちの１より多くのセットは、特に、１種より多くのリガンドが膜表面に付着される場合に使用され得る。この状況では、旧来のｐｅｐ－ＭＨＣ－ストレプトアビジンテトラマー技術はまた、ある種のｐｅｐ－ＭＨＣ特異性のＴ細胞をスクリーニングするために使用され得る。しかし、同じ特異性を有するＴ細胞は、同じ抗原刺激によって活性化されてもよいし、活性化されなくてもよい。免疫応答（例えば、ワクチン接種［ウイルスまたはがんのワクチン］に対する応答、免疫寛容、自己免疫）を研究するために、それらの抗原に対する応答性に基づいて、Ｔ細胞を区別することは、重要である。Ｔ細胞活性化の指標として顕微鏡検査法によるカルシウムフラックスを使用して、本発明はまた、特定の抗原に応答する初代Ｔ細胞を定量するためにスクリーニングアッセイを提供する。あるいは、ビオチン化ｐｅｐ－ＭＨＣおよび共刺激分子は、ストレプトアビジン被覆チップ上にカップリングされ得、そのチップは、本発明の足場と対にされる。

【０２２１】

別の実施形態において、機能的分子は、ＭＳＲ基部層および／またはＳＬＢ層に化学的にカップリングされる。ある種の実施形態において、化学的カップリングとしては、クリックケミストリー、例えば、アジド－アルキン化学（ＡＡＣ）反応、ジベンゾ－シクロオクチン連結（ＤＣＬ）、またはテトラジン－アルケン連結（ＴＡＬ）が挙げられる。例えば、ＡＡＣの状況では、ＭＳＲまたはＳＬＢのいずれかが、複数の単一クリックケミストリー官能基を含み、そしてしばしば２種、３種またはこれより多くのこのような官能基を含む。１分子あたり１種または２種のこのような官能基が好ましい。一実施形態において、クリック可能試薬（ｃｌｉｃｋａｂｌｅ　ｒｅａｇｅｎｔ）（例えば、３－アジドプロピルアミンまたは１０－ウンデシン酸）は、相当するアルキンまたはアジド化合物および適切な触媒とのクリック反応を介してそれぞれ、ペプチドまたはタンパク質のカルボキシ末端またはアミノ末端にアミド結合されて、１，２，３－トリアゾール環連結基を形成し得る。例えば、米国公開番号２００７／００６０６５８を参照のこと。生体直交型銅非含有クリック試薬（ｂｉｏｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ　ｃｏｐｐｅｒ－ｆｒｅｅ　ｃｌｉｃｋ　ｒｅａｇｅｎｔ）の武器をさらに拡大するために、アジドカップリング反応のアザ－ジベンゾシクロオクチン（ＡＤＩＢＯ）含有化合物は、タンパク質機能的分子（例えば、抗体、インターロイキンおよびサイトカイン）の部位特異的共有結合的なアンカーによる固定（ａｎｃｈｏｒｉｎｇ）のために使用され得る。その同じ金属非含有クリック反応は、表面の非官能化領域のＰＥＧ化のために使用される。このような処理は、非特異的結合の劇的低減または完全な排除を可能にする。その銅非含有クリック固定化法は、種々のタイプのアレイの調製、ならびにマイクロビーズおよびナノ粒子の誘導体化に適用され得る。例えば、米国特許第８，９１２，３２２号を参照のこと。いくつかの実施形態において、機能的分子は、アジド、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、トランスシクロオクテン、テトラジンおよびノルボルネンならびにこれらの改変体からなる群より選択されるクリック試薬を使用してＭＳＲ基部層および／またはＳＬＢ層にカップリングされる。いくつか

の実施形態において、機能的分子は、アジドを含み、ＭＳＲ－ＳＬＢの脂質二重層の脂質は、ＤＢＣＯを含む。

【０２２２】

用語「クリックケミストリー（ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）とは、反応性基を含む小さな単位を一緒に結合することによって迅速かつ信頼性高く共有結合を生成するように目的に合わせて作られる化学現象を記載する、Ｔｈｅ　Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＩｎｓｔｉｔｕｔｅのＫ．　Ｂａｒｒｙ　Ｓｈａｒｐｌｅｓｓによって導入された化学原理をいう。クリックケミストリーは、特定の反応に言及するのではなく、天然において見出される反応を模倣する反応を含む概念に言及する。いくつかの実施形態において、クリックケミストリー反応は、モジュール性であり、範囲が広く、高化学収量を与え、害にならない副生成物を生成し、立体特異的であり、単一の反応生成物を伴う＞８４ｋＪ／モルの反応に都合のよい大きな熱力学的駆動力を示し、そして／または生理学的条件下で行われ得る。明確な発熱反応は、反応物を「飛躍的に効率的に」作製する。いくつかの実施形態において、クリックケミストリー反応は、高原子効率を示し、単純な反応条件下で行われ得、容易に利用可能な出発物質および試薬を使用し、毒性溶媒を使用しないか、または温和なもしくは容易に除去可能な溶媒（好ましくは、水）を使用し、そして／あるいはクロマトグラフィーでない方法（結晶化または蒸留）によって単純な生成物単離を提供する。

【０２２３】

用語「クリックケミストリーハンドル（ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｈａｎｄｌｅ）」とは、本明細書で使用される場合、クリックケミストリー反応に参加し得る反応物、または反応性基に言及する。例えば、歪みアルキン、例えば、シクロオクチンは、クリックケミストリーハンドルである。なぜならそれは、歪み促進型環化付加に参加し得るからである。一般に、クリックケミストリー反応は、互いと反応し得るクリックケミストリーハンドルを含む少なくとも２種の分子を要求する。このような互いと反応性であるクリックケミストリーハンドル対はときおり、パートナークリックケミストリーハンドルと本明細書で言及される。例えば、アジドは、シクロオクチンまたは任意の他のアルキンに対するパートナークリックケミストリーハンドルである。本発明のいくつかの局面に従って使用するのに適した例示的クリックケミストリーハンドルは、本明細書で、例えば、ＵＳ２０１４／０２４９２９６で記載される。他の適切なクリックケミストリーハンドルは、当業者に公知である。

【０２２４】

一実施形態において、本発明は、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を、必要に応じてＴ細胞ホメオスタシス因子と一緒に含むＡＰＣ－ＭＳを提供し、これらは、その足場へと金属－キレート化脂質ヘッド基を介して吸着される。Ｍａｌｏｎｅｙら，Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．，　３（３）：１８５－９２，　１９９６を参照のこと。キレート化金属イオンを使用するいくつかのアプローチは、ヒスチジンタグ化タンパク質が、いくつかのタイプの界面（例えば、脂質界面および金属－キレート化脂質を有する脂質単層、金属キレート化アルカンチオールと形成される自己アセンブリ単層を有する金表面、および金属キレート化シランを有するオキシド表面）において固定化されることを可能にすることを報告した。例えば、Ｐｅｔｅｒｓｏｎら（米国特許第５，６７４，６７７号）は、有機キレート化剤をタンパク質（例えば、酵素）にカップリングし、そしてそのキレート化剤を金属イオンで荷電することによって２種のアミノ酸配列を連結するための方法を記載する。次いで、この複合体は、ヒスチジンタグを含む任意のタンパク質と混合されて、その複合体をヒスチジンタグ化タンパク質とカップリングする。米国特許第６，０８７，４５２号（これは、その全体において本明細書に参考として援用される）もまた参照のこと。

【０２２５】

本発明の機能的分子は、好ましくは、タンパク質である。用語「タンパク質（ｐｒｏｔｅｉｎ）」、「ペプチド（ｐｅｐｔｉｄｅ）」および「ポリペプチド（ｐｏｌｙｐｅｐ

ｔｉｄｅ）」は、交換可能に使用され、ペプチド（アミド）結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基のポリマーに言及する。この用語は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドに言及する。代表的には、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、少なくとも３個のアミノ酸の長さである。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、個々のタンパク質またはタンパク質の集まりに言及し得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドの中のアミノ酸のうちの１個またはこれより多くが、例えば、化学的実体（例えば、カルボキシレート基、ヒドロキシル基、ホスフェート基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、結合体化、官能化、または他の改変のためのリンカーなど）の付加によって改変され得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドはまた、単一の分子であってもよいし、複数分子の複合体であってもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、単に、天然に存在するタンパク質またはペプチドのフラグメントであり得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在しても、組換えであっても、または合成であっても、またはこれらのうちのいずれかの組み合わせであってもよい。

【０２２６】

用語「結合体化され（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ）または「結合体化（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）」とは、２種の分子、例えば、２種のタンパク質を、これらが直接的なまたは間接的な共有結合的または非共有結合的な相互作用によって連結されるような方法で互いと会合することに言及する。クリックケミストリーを介する結合体化の状況では、その結合体化は、クリックケミストリーハンドルの反応によって形成される共有結合を介してであり得る。ある種の実施形態において、その会合は共有結合的であり、そしてその実体は、互いに「結合体化される」といわれる。いくつかの実施形態において、タンパク質は、別の分子、例えば、第２のタンパク質に、そのタンパク質と他の分子との間に、そのタンパク質が翻訳された後に、そしていくつかの実施形態では、そのタンパク質が単離された後に共有結合を形成することによって翻訳後に結合体化される。いくつかの実施形態において、そのタンパク質および第２の分子、例えば、第２のタンパク質の翻訳後結合体化は、そのタンパク質上にクリックケミストリーハンドルを、およびその第２の分子上に第２のクリックケミストリーハンドル（これは、その第１のクリックケミストリーハンドルに反応し得る）を取り付け、そしてクリックケミストリーハンドルが反応し、そのタンパク質と第２の分子との間で共有結合を形成するクリックケミストリー反応を行い、従って、キメラタンパク質を生成することを介してもたらされる。いくつかの実施形態において、２種のタンパク質は、それらそれぞれのＣ末端において結合体化され、Ｃ－Ｃ結合体化キメラタンパク質を生成する。いくつかの実施形態において、２種のタンパク質は、それらそれぞれのＮ末端において結合体化され、Ｎ－Ｎ結合体化キメラタンパク質を生成する。

【０２２７】

ある種の実施形態において、複数の検出可能な標識は、結合体化プロセスを分析および／または研究するために使用され得る。本明細書で使用される場合、「検出可能な標識（ｄｅｔｅｃｔａｂｌｅ　ｌａｂｅｌ）」とは、その分子（例えば、タンパク質もしくはポリペプチド）またはその標識が付着される他の実体の検出を可能にする部分へと組み込まれた少なくとも１種の元素、同位体、または官能基を有する部分をいう。標識は、直接的に（すなわち、結合を介して）付着され得るか、またはテザー（例えば、テザーを作製し得る、必要に応じて置換されたアルキレン；必要に応じて置換されたアルケニレン；必要に応じて置換されたアルキニレン；必要に応じて置換されたヘテロアルキレン；必要に応じて置換されたヘテロアルケニレン；必要に応じて置換されたヘテロアルキニレン；必要に応じて置換されたアリーレン；必要に応じて置換されたヘテロアリーレン；または必要に応じて置換されたアシレン（ａｃｙｌｅｎｅ）、またはこれらのうちの任意の組み合わせのような））によって付着され得る。その標識は、分子、例えば、タンパク質、ポリペプチド、または他の実体へと、任意の位置において付着または組み込まれ得ることが認識される。

【０２２８】

一般に、標識は、５つのクラスのうちのいずれか１つ（またはこれより多く）に入り得る：ａ）同位体部分（これは、放射反応性または重い同位体であり得る）を含む標識（^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{18}Ｆ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{67}Ｇａ、^{99}ｍＴｃ（Ｔｃ－９９　ｍ）、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、および^{186}Ｒｅが挙げられるが、これらに限定されない）；ｂ）免疫部分を含む標識（これは、抗体または抗原であってもよいし、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼのような）に結合されてもよい）；ｃ）着色、発光、リン光、または蛍光の部分である標識（例えば、蛍光標識フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）またはカルボキシフルオレセインのような）；ｄ）１種またはこれより多くの光親和性部分を有する標識；ならびにｅ）１種またはこれより多くの公知の結合パートナー（例えば、ビオチン－ストレプトアビジン、ＦＫ５０６－ＦＫＢＰ）のリガンドである標識。ある種の実施形態において、標識は、放射活性同位体、好ましくは検出可能な粒子を発する同位体を含む。ある種の実施形態において、その標識は、蛍光部分を含む。ある種の実施形態において、その標識は、蛍光標識、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）である。ある種の実施形態において、その標識は、１種またはこれより多くの公知の結合パートナーを有するリガンド部分を含む。ある種の実施形態において、その標識は、ビオチンを含む。いくつかの実施形態において、標識は、蛍光ポリペプチド（例えば、ＧＦＰまたはその誘導体（例えば、増強ＧＦＰ（ＥＧＦＰ））））またはルシフェラーゼ（例えば、ホタル、Ｒｅｎｉｌｌａ、またはＧａｕｓｓｉａのルシフェラーゼ）である。ある種の実施形態において、標識が適切な基質（例えば、ルシフェリン）と反応して、検出可能なシグナルを生成し得ることは理解される。蛍光タンパク質の非限定的な例としては、ＧＦＰおよびその誘導体、種々の色の光を発する発色団を含むタンパク質（例えば、赤、黄色、およびシアン蛍光タンパク質など）が挙げられる。例示的な蛍光タンパク質としては、以下が挙げられる：例えば、Ｓｉｒｉｕｓ、Ａｚｕｒｉｔｅ、ＥＢＦＰ２、ＴａｇＢＦＰ、ｍＴｕｒｑｕｏｉｓｅ、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＴａｇＣＦＰ、ｍＴＦＰ１、ｍＵｋＧ１、ｍＡＧ１、ＡｃＧＦＰ１、ＴａｇＧＦＰ２、ＥＧＦＰ、ｍＷａｓａｂｉ、ＥｍＧＦＰ、ＴａｇＹＰＦ、ＥＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、ＳＹＦＰ２、Ｖｅｎｕｓ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、ｍＫＯ、ｍＫＯ２、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ２、ＴａｇＲＦＰ、ＴａｇＲＦＰ－Ｔ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、ｍＲｕｂｙ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ｍＮｅｐｔｕｎｅ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ｍＡｍｅｔｒｉｎｅ、ｍＫｅｉｍａ。例えば、Ｃｈａｌｆｉｅ，　Ｍ．　ａｎｄ　Ｋａｉｎ，　Ｓ　Ｒ（編）　Ｇｒｅｅｎ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　ｐｒｏｔｅｉｎ：　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，　ａｎｄ　ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，　ｖ．　４７）．　Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，　Ｈｏｂｏｋｅｎ，　Ｎ．Ｊ．，　２００６、ならびに／またはＧＦＰおよび多くの他の蛍光もしくは発光タンパク質の考察に関してはＣｈｕｄａｋｏｖら，　Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｒｅｖ．　９０（３）：１１０３－６３，　２０１０を参照のこと。いくつかの実施形態において、標識は、ダーククエンチャー（例えば、発蛍光団からの励起エネルギーを吸収し、熱としてエネルギーを放散する物質）を含む。

【０２２９】

別の実施形態において、機能的分子は、当該分野で公知の共有結合的または非共有結合的な負荷技術を使用して、メソポーラスシリカおよび／または脂質二重層上に負荷され得る。一実施形態において、機能的分子は、非共有結合的に負荷される。例えば、Ｌｅｉら（米国公開番号２０１１－０２５６１８４）は、天然のまたは官能化された構造内に非共有結合を介してＩｇＧのような抗体の増強された自発的負荷を提供するメソポーラスシリケートを記載する。よって、本発明の足場は、このようなシリケートで製剤化され得る。

【０２３０】

別の実施形態において、機能的分子は、ＭＳＲ上に化学的にカップリングされる。このような実施形態において、そのカップリングは、以下の分子およびその中に含まれる反応性基のうちの１種またはこれより多くを利用することによって行われ得る：システイン（

チオール基）、セリンまたはスレオニン（ヒドロキシル基）、リジン（アミノ基）、アスパラギン酸またはグルタミン酸（カルボキシル基）。あるいは、その機能的分子は、ポリヒスチジンタグ（Ｈｉｓタグ）、ポリヒスチジンタグを含むペプチドまたはポリヒスチジンタグを含む抗体の利用を介してＭＳＲに結合体化され得る。本明細書において、そのポリヒスチジンタグは、少なくとも４個、５個、６個または７個のヒスチジン（Ｈｉｓ）残基からなる。

【０２３１】

一実施形態において、アンカー（ａｎｃｈｏｒ）は、機能的分子を孔の壁に接続するために使用される。しかし、そのアンカーは、必須の構成要素ではない。ある種の実施形態において、メソポーラスシリカの各孔は、少なくとも１つの機能的分子に適合する。従って、その孔は、生物学的物質を固定化するために適したサイズを有しなければならない。孔のサイズは、固定化されるべき機能的分子のサイズに依存する。機能的分子が孔に固定化される場合、その機能的分子は、静電的結合によってその孔の内表面に吸着され得る。機能的分子はまた、非共有結合的結合（例えば、ファン・デル・ワールス力、水素結合、またはイオン結合）によって孔の中に維持され得る。

【０２３２】

ＭＳＲがアンカーにより固定する部分を含む前述の実施形態において、そのアンカーは、機能的分子の大きな構造変化を低減して、これを安定して維持するという効果を有し得る。好ましくは、そのアンカーは、メソポーラス材料と実質的に同じ構成要素から構成される。そのアンカーは、所望の機能的分子への結合を可能にする１種またはこれより多くの官能基：ヒドロキシル基、アミド基、アミノ基、ピリジン基、ウレア基、ウレタン基、カルボキシル基、フェノール基、アゾ基、ヒドロキシル基、マレイミド基、シラン誘導体、またはアミノアルキレン基を含み得る。

【０２３３】

本発明の実施形態はさらに、本発明のＭＳＲ－ＳＬＢ足場（脂質マトリクスの中に吸着される複数の前述の機能的分子を含むこのような足場を含む足場が挙げられる）に関する。

【０２３４】

一実施形態において、機能的分子は、物理的挿入を介して支持脂質二重層の中に吸着される。両親媒性分子の二重層の中にタンパク質を挿入するための技術は、当該分野で公知である。一実施形態において、二重層の環境の中、例えば、疎水性媒体および／または親水性本体および／または水和支持体の中にあるタンパク質は、その二重層の中に自発的に挿入され得る。あるいは、タンパク質は、電圧の印加によっておよび／またはタンパク質負荷小胞と二重層との融合によって、二重層の中に押しやられ得る。その小胞は、親水性本体の中に含まれてもよいし、その本体へと導入されてもよい。一例では、タンパク質は、ＰＣＴ公開番号ＷＯ　２００９／０２４７７５に開示されるプローブ法を使用することによって膜の中に導入され得る。その挿入されたタンパク質は、公知の膜会合タンパク質（例えば、前述のＴ細胞活性化分子および／またはＴ細胞共刺激分子のうちの１種もしくはこれより多く）であり得る。

【０２３５】

別の実施形態において、機能的分子は、Ｔ細胞の拡大において使用される抗原であり得る。Ｔ細胞拡大において使用可能なこのような抗原の代表的な例としては、全長ＣＤ１９またはそのフラグメントまたはその改変体が挙げられる。ＣＤ１９は、キメラ抗原レセプター（ＣＡＲ）Ｔ細胞の拡大において使用される基本型の抗原である。Ｔｕｒｔｌｅら，Ｂｌｏｏｄ，１２６：１８４，２０１５；Ｔｕｒｔｌｅら，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．，１２６，２１２３－３８，２０１６を参照のこと。別の実施形態において、その抗原は、全長ＣＤ２２またはそのフラグメントまたはその改変体であり、これらはまた、ＣＡＲ　Ｔ細胞の拡大において有用である。Ｈａｓｏら，Ｂｌｏｏｄ，１２１（７）：１１６５－１１７４，２０１３；Ｑｉｎら，Ｂｌｏｏｄ，１２２：１４３１，２０１３を参照のこと。

【０２３６】
代替の実施形態において、機能的分子は、二重層へと直接的または間接的にアンカーにより固定される膜会合タンパク質であり得る。他の機能的分子（例えば、選択的もしくは非選択的膜輸送タンパク質、イオンチャネル、孔形成タンパク質または膜内在レセプター（ｍｅｍｂｒａｎｅ－ｒｅｓｉｄｅｎｔ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ）など）はまた、この方法を介してＳＬＢの中に挿入され得る。
【０２３７】
別の実施形態において、機能的分子は、ＳＬＢと会合するおよび／またはＳＬＢの中に挿入する膜会合タンパク質（例えば、グラミシジン）；αヘリックスバンドル（例えば、バクテリオロドプシンもしくはＫ＋チャネル）；およびβバレル（例えば、α－溶血素、ロイコシジンもしくはＥ．ｃｏｌｉポリン）；またはこれらの組み合わせに結合体化され得る。
【０２３８】
ある種の実施形態において、製作されたＳＬＢ（１種またはこれより多くの機能的分子を含む）は、イオン性または非イオン性の界面活性剤のような化合物によって安定化され得る。適切な界面活性剤としては、以下の例が挙げられるが、これらに限定されない：合成リン脂質、これらの水素化誘導体および混合物、スフィンゴ脂質および糖スフィンゴ脂質、飽和もしくは不飽和の脂肪酸、脂肪アルコール、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー、エトキシル化脂肪酸およびそのエステルもしくはエーテル、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、または上記で言及されたもののうちの２種もしくはこれより多くの組み合わせ。本発明に従う好ましい界面活性剤は、ジミリストイルホスファチジルグリセロールである。
【０２３９】
製作されたＳＬＢは、ブタノール、酪酸、ヘキサン酸、コール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウムおよびグリココール酸ナトリウムを含むかまたはこれらからなる群の中で選択される少なくとも１種の補助界面活性剤、より具体的には、コール酸ナトリウムによって必要に応じて安定化され得る。
【０２４０】
製作されたＳＬＢはまた、他の賦形剤（例えば、生体接着性または吸着増強特性を有するポリマー）を含み得、アクリルポリマー（ＣＡＲＢＯＰＯＬ（登録商標）、Ｐｏｌｙｃａｒｂｏｐｈｉｌ、ＮＯＶＥＯＮ（登録商標））、中鎖脂肪酸およびポリエチレングリコールを含むかまたはこれらからなる群より選択され得る。好ましい賦形剤は、上記で言及したアクリルポリマーである。
【０２４１】
ＳＬＢは、膜会合タンパク質を検出するための試薬で改変され得る。好ましくは、その膜会合タンパク質は、イオンチャネルタンパク質および／または孔形成タンパク質である。好ましくは、その膜会合タンパク質は、二重層において特性の検出可能な変化を引き起こして、二重層の中に拡散するおよび／または二重層と会合する。その変化した特性は、物理的、光学的、電気的または生化学的であり得る。
【０２４２】
いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、低分子薬物を含む。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、サロミドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、ＩＤＯ／ＭＥＫインヒビターを含む。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場および／または抗原提示細胞模倣足場は、免疫調節効果を有する低分子薬物を含む。免疫調節効果を有する低分子薬物は、当該分野で公知である（例えば、Ｍｕｒｐｈｙら　Ｈｕｍ．　Ｖａｃｃｉｎ．　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．　１１（１０）：　２４６３－８（２０１５）（その内容全体は、本明細書に明示的に参考として援用される）を参照のこと）。
【０２４３】

ある種の実施形態において、機能的分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場は、二重層の中の両親媒性分子とおよび／または二重層の中の機能的分子と相互作用し得る細胞を検出するために使用され得る。その相互作用は、本質的に特異的であってもよいし、非特異的であってもよい。あるいは、その細胞は、物理的、光学的、電気的、または生化学的な変化を引き起こすために、機能的分子と、または脂質二重層と相互作用してもよい。このような相互作用は、多くの異なる方法（視覚的な変化によって、ＳＬＢの中の蛍光標識された脂質もしくはタンパク質の活性化、またはＳＬＢのキャパシタンスの変化を介して、が挙げられるが、これらに限定されない）で検出され得る。

【０２４４】

生分解性足場

本発明の実施形態はさらに、生分解性足場に関する。一実施形態において、その足場構造は、生物学的環境に曝される場合に、実質的に分解し得る。一実施形態において、その生物学的環境は、組織培養条件、例えば、リンパ球（例えば、Ｔ細胞）を培養するために必要に応じて適合された組織培養培地である。別の実施形態において、その生物学的環境は、生物学的流体、例えば、血液、リンパ液、ＣＳＦ、腹水などである。さらに別の実施形態において、その生物学的環境は、移植部位における組織環境（例えば、血管、リンパ系、脂肪組織など）である。

【０２４５】

ある種の実施形態において、生分解性足場は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７，日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、２０日間、３０日間、４５日間、６０日間、９０日間、または９０日間超にわたるインビボでの生物学的環境との接触後に実質的に分解される。ある種の実施形態において、生分解性足場は、１週間未満でインビボでの生物学的環境との接触後に実質的に分解される。ある種の実施形態において、生分解性足場は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７，日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、２０日間、３０日間、４５日間、６０日間、９０日間、または９０日間超にわたるインビトロでの生物学的環境との接触後に実質的に分解される。ある種の実施形態において、生分解性足場は、１週間未満でインビトロの生物学的環境との接触後に実質的に分解される。実質的な分解とは、足場組成物のうちの少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または９５％超が、その足場組成物が生物学的環境と接触されている場合に分解することを意味する。

【０２４６】

ある種の実施形態において、生分解性足場を使用することは有利であり得る。例えば、足場組成物を、これがインキュベーション期間の間に（例えば、Ｔ細胞が拡大することが可能にされる場合に）実質的に分解するように製作することによって、さらなる精製および／または製剤化工程に供する必要なしに、拡大されたＴ細胞を使用することは、可能である得る。下流の精製および／または製剤化工程を回避することは、Ｔ細胞が所望の適用のために所望の機能性に適合し、その機能性を有することを担保する。

【０２４７】

よって、ある種の実施形態において、足場組成物の分解動態を、メソポーラスシリカロッドの特性（例えば、サイズ、幾何形状、多孔性）を改変することによって目的に合わせて作ることは、有利であり得る。あるいは、足場組成物の分解動態は、培養条件を変化させることによって（例えば、培地のｐＨを調節することによって）改変され得る。

【０２４８】

前述の目的によれば、本発明の実施形態は、必要に応じて生分解性である、複数の機能的分子を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。一実施形態において、本発明の足場は、他の生分解性足場へと被包され得る。このような複合生分解性足場組成物を作製するにあたって有用である試薬および技術は、当該分野で公知である。Ｌｉａｏら，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．Ｂ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｍａｔｅｒ．，１０２（

２）：２９３－３０２，２０１４を参照のこと。一実施形態において、足場は、生理学的に適合性でありかつ必要に応じて生分解性のポリマーから作製される。足場において使用可能なポリマーの例は、当該分野で公知である。例えば、米国公開番号２０１１／００２０２１６（その内容全体は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。このようなポリマーの代表的な例としては、ポリ（ラクチド）、ポリ（グリコリド）、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリエーテルエステル、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリカーボネート、ポリシアノアクリレート、ポリウレタン、ポリアクリレートおよびこれらのブレンドまたはコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。生分解性足場は、生分解性物質、例えば、コラーゲン、アルギネート、ポリサッカリド、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（グリコリド）（ＰＧＡ）、ポリ（Ｌ－ラクチド）（ＰＬＡ）、またはポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）またはシルクを含み得る。足場組成物を製作するための方法は、当該分野で公知である。例えば、Ｍａｒｔｉｎｓｅｎら（Ｂｉｏｔｅｃｈ．＆Ｂｉｏｅｎｇ．，３３（１９８９）７９－８９），（Ｍａｔｔｈｅｗら（Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，１６（１９９５）２６５－２７４），Ａｔａｌａら（Ｊ Ｕｒｏｌｏｇｙ，１５２（１９９４）６４１－６４３）、およびＳｍｉｄｓｒｏｄ（ＴＩＢＴＥＣＨ８（１９９０）７１－７８）（これらの開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０２４９】

例示的な足場は、比較的低分子量の、好ましくは、溶解後に、ヒトによるクリアランスに関して腎閾値にあるサイズのグリコリドまたはアルギネートを利用し、例えば、そのアルギネートまたはポリサッカリドは、１０００～８０，０００ダルトンの分子量に低減される。好ましくは、その分子質量は、１０００～６０，０００ダルトン、特に好ましくは、１０００～５０，０００ダルトンである。高グルロネート含有量のアルギネート物質を使用することも有用である。なぜならグルロネートユニットは、マンヌロネートユニットとは対照的に、二価カチオンを通じてイオン性架橋のための部位を提供して、ポリマーをゲル化するからである。例えば、米国特許第６，６４２，３６３号（本明細書に参考として援用される）は、ポリサッカリド（例えば、アルギネート）を含むポリマーを作製および使用するための方法を開示する。

【０２５０】

本発明の足場は、足場が抗原提示を維持し得、免疫細胞を誘引および操作し得るように多孔性であり得る。一実施形態において、足場は、多孔性マトリクスを含み、ここでその孔は、１０ｎｍ～５００μｍの間、特に、１００ｎｍ～１００μｍの間の直径を有する。これらの実施形態において、本発明は、メソポーラス足場を含む足場を利用する。所望の孔サイズおよび孔アラインメントを有するポリマーマトリクスを作製するための方法は、当該分野で、例えば、米国公開番号２０１１／００２０２１６および米国特許第６，５１１，６５０号（これらは、本明細書に参考として援用される）に記載される。

【０２５１】

メソポーラスシリカロッドは、薬物（例えば、化学療法剤およびＤＮＡ／ｓｉＲＮＡ、抗体およびタンパク質生物製剤、細胞など）を送達するための多機能送達プラットフォームへと改変され得る（Ｌｅｅら，Ａｄｖ．Ｆｕｎｃｔ．Ｍａｔｅｒ．，２１５－２２２，２００９；Ｌｉｏｎｇら，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，８８９－８９６，２００８；Ｍｅｎｇら，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，４５３９－４５５０，２０１０；Ｍｅｎｇら，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２６９０－１２６９７，２０１０；Ｘｉａら，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，３２７３－３２８６，２００９；Ｒａｄｕら，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３２１６－１３２１７，２００４；Ｓｌｏｗｉｎｇら，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，８８４５－８８４９，２００７）。この送達プラットフォームは、制御されかつ要求に応じた送達のための、送達部位をも画像化するさらなる能力を有する、疎水性および荷電した抗がん薬の有効かつ保護的なパッケージングを可能にする（Ｌｉｏｎｇら，ＡＣＳ Ｎａｎｏ，ｖｏｌ

．２，ｐｐ．８８９－８９６，２００８）。現在の重要な難題は、効率的かつ安全なインビボでの薬物送達のためのデザインの特徴を最適化することであり（Ｈｅら，Ｓｍａｌｌ，ｖｏｌ．７，ｐｐ．２７１－２８０，２０１１；Ｌｅｅら，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．，ｖｏｌ．４９，ｐｐ．８２１４－８２１９，２０１０；Ｌｉｕら，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，ｖｏｌ．３２，ｐｐ．１６５７－１６６８，２０１１；Ａｌ Ｓｈａｍｓｉら，Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．，ｖｏｌ．２３，ｐｐ．１７９６－１８０５，２０１０）、これらは、ヌードマウスにおけるヒト異種移植片腫瘍の使用を通じて評価され得る（Ｌｕら，Ｓｍａｌｌ，ｖｏｌ．６，ｐｐ．１７９４－１８０５，２０１０）。

【０２５２】

本明細書で記載される実施形態はさらに、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場（このような足場を含む足場が挙げられる）に関し、ここでメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　Ｔ細胞活性化／共刺激分子の乾燥重量比は、約１：１～約１００：１の間、好ましくは約１０：１～約５０：１の間、特に約２０：１～約５０：１の間である。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場のメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　Ｔ細胞活性化／共刺激分子の乾燥重量比は、約１０，０００：１～約１：１の間である。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場のメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　Ｔ細胞活性化／共刺激分子の乾燥重量比は、約５，０００：１～約１：１の間、約１，０００：１～約１：１の間、約５００：１～約１：１の間、約１００：１～約１：１の間である。いくつかの実施形態において、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場のメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　Ｔ細胞活性化／共刺激分子の乾燥重量比は、約１０，０００：１、約５，０００：１、約２，５００：１、約１，０００：１、約７５０：１、約５００：１、約２５０：１、約１００：１、約７５：１、約５０：１、約４０：１、約３０：１、約２５：１、約２０：１、約１０：１、または約１：１である。

【０２５３】

本明細書で記載される実施形態はさらに、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を、機能的分子（例えば、Ｔ細胞活性化分子、Ｔ細胞共刺激分子、およびＴ細胞ホメオスタシス因子）と一緒に、必要に応じて１種もしくはこれより多くのさらなる薬剤（以下で列挙）と一緒に含む前述の足場を含む組成物およびデバイスに関する。一実施形態において、本発明は、足場およびその中にクラスター化したＴ細胞を含む組成物を提供する。一実施形態において、そのＴ細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される。他の実施形態において、その組成物は、薬学的組成物であり得、これは、当該分野で周知の方法を使用して生成され得る。例えば、薬学的組成物は、医科学の許容された原理を使用して、当業者によって生成され得る。その組成物、足場、およびデバイスは、目的の細胞を選択し、培養し、拡大し、維持し、そして／または移植するための１種またはこれより多くの試薬とともに提供され得る。Ｔ細胞、Ｂ細胞および抗原提示細胞に関する細胞選択キット、培養キット、拡大キット、移植キットの代表的な例は、当該分野で公知である。例えば、目的の標的細胞がＴ細胞である場合、このような細胞は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ、ＭＡＣＳ－ｂｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して最初にソートされ得、ＳＴＥＭＸＶＩＶＯヒトＴ細胞基礎培地（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）中で維持され得、ＯＰＴＩＭＩＺＥＲ培養培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で拡大され得る。その細胞は、当業者に公知の遠心分離技術（例えば、ＦＩＣＯＬＬ（登録商標）勾配が挙げられる）を使用することによってサンプル中で富化され得る。細胞はまた、ある種のマーカーの発現に基づいて、正の選択、負の選択、またはこれらの組み合わせを使用することによってサンプル中で富化され得る。

【０２５４】

本発明のさらなる実施形態は、Ｔ細胞操作デバイスに関する。そのデバイスは、本発明の足場を、標的Ｔ細胞を誘引／結合する複数の分子と一緒に含む。一実施形態において、

本発明は、メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）へのＴ細胞の浸潤を選択的に可能にするように積み重ねられた足場を含むデバイスに関する。選択的浸潤とは、選択的許容性／透過性、結合の特異性、選択的排除（望ましくない細胞の）および／または拡大（望ましい細胞の）のせいで、その足場が、全血中に存在する標的Ｔ細胞と比較して、インキュベーション期間後に、少なくとも１０％超、２０％超、３０％超、４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、９０％超、１００％超、１５０％超、２００％超、３００％超、４００％超、５００％超、６００％超、８００％超、１０００％超、またはこれより多くの数の標的Ｔ細胞を含むことを意味する。ある種の実施形態において、そのインキュベーション期間は、１～３０日間の間、好ましくは４～１５日間の間、特に７～１２日間の間である。他の実施形態において、選択的浸潤は、他の血球（例えば、全血中に存在するＢ細胞、樹状細胞、マクロファージ、赤血球または血小板）と比較して、Ｔ細胞の保持および／または拡大に関する。

【０２５５】

他の実施形態において、本発明の足場は、Ｔ細胞、例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、または調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の特定の部分集団の選択的浸潤を可能にする。本明細書では、足場は、全血中に存在する標的Ｔ細胞と比較して、４～１４日間のインキュベーション後に少なくとも１０％超、２０％超、３０％超、４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、９０％超、１００％超、１５０％超、２００％超、３００％超、４００％超、５００％超、６００％超、８００％超、１０００％超、またはこれより多くの数の標的Ｔ細胞を含む。ヒト全血中の種々のタイプのリンパ球のパーセンテージおよび範囲は、以下のとおりである：ＮＫ細胞　７％（範囲：２～１３％）；ヘルパーＴ細胞　４６％（範囲：２８～５９％）；細胞傷害性Ｔ細胞　１９％（範囲：１３～３２％）；γδ　Ｔ細胞　５％（範囲：２％～８％）；Ｂ細胞　２３％（範囲：１８～４７％）（Ｂｅｒｒｉｎｇｔｏｎら，　Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１４０（２）：　２８９－２９２，　２００５）。

【０２５６】

さらなる薬剤

本発明の足場は、１種またはこれより多くの薬剤を含み、これらは、天然に存在するか、合成して生成されるか、または組換えの化合物（例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、低分子、ハプテン、炭水化物、または他の薬剤）であり得る（これらのフラグメントまたはこれらの組み合わせを含む）。一実施形態において、その薬剤は、抗原である。一実施形態において、その抗原は、ペプチドもしくはタンパク質またはその免疫学的に活性なフラグメントである。一実施形態において、本明細書で記載される抗原は精製される。精製された化合物は、少なくとも６０重量％（乾燥重量）の目的の化合物を含む。特に、その抗原は、少なくとも７５％純粋、好ましくは少なくとも９０％純粋、およびより好ましくは少なくとも９９％純粋である。純度は、任意の適切な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、またはＨＰＬＣ分析によって、測定される。その抗原は、自己抗原であってもよいし、非自己抗原であってもよい。

【０２５７】

非自己抗原の代表的な例としては、例えば、ウイルス、細菌、原生動物、寄生生物、および真菌からなる群より選択される病原体に由来する抗原が挙げられる。その抗原は、ＭＨＣ分子（例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＤＰ、ＤＱおよびＤＲ）上に必要に応じて負荷され得、次いで、これらは、足場へと組み込まれる。

【０２５８】

あるいは、足場は、複数の自己抗原（これらは、必要に応じて疾患または障害と連鎖するかまたは関連する）を含む。好ましくは、その自己抗原は、ヒトの疾患または障害と特異的に関連する。一実施形態において、その自己抗原は、関節リウマチ、狼瘡、セリアック病、炎症性腸疾患もしくはクローン病、シェーグレン症候群、リウマチ性多発筋痛（ｐｏｌｙｍｙａｌｇｉａ　ｒｈｅｕｍａｔｉｃ）、多発性硬化症、強直性脊椎炎、Ｉ型糖尿病、円形脱毛症、血管炎、側頭動脈炎などからなる群より選択される自己免疫障害と関連

する。Ｉ型糖尿病、多発性硬化症、クローン病、および関節リウマチなどと関連する抗原の特異的タイプ（そのフラグメントを含む）は、文献中で特徴づけられている。例えば、関節リウマチ関連抗原は、４７ｋＤａタンパク質（ＲＡ－Ａ４７）である。Ｈａｔｔｏｒｉら，Ｊ Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ Ｍｅｔａｂ．，１８（６）：３２８－３４（２００）を参照のこと。クローン病において、その抗原は、細菌のフラジェリンであり得る。Ｌｏｄｅｓら，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１１３（９）：１２９６－３０６（２００４）を参照のこと。同様に、主要ミエリンタンパク質（例えば、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）およびプロテオリピドタンパク質（ＰＬＰ））は、多発性硬化症（ＭＳ）の経過において重要であるようである。ｄｅＲｏｓｂｏら，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．９２（６）：２６０２－２６０（１９９３）を参照のこと。Ｉ型糖尿病の状況では、複数の自己抗原が関わり得る（例えば、プレプロインスリン（ＰＰＩ）、膵島特異的グルコース－６－ホスファターゼ（ＩＧＲＰ）、グルタメートデカルボキシラーゼ（ＧＡＤ６５）、インスリノーマ抗原－２（ＩＡ－２）、クロモグラニンＡおよびヒートショックタンパク質６０）。Ｒｏｅｐら，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｍｅｄ．２（４），２０１２（ＰＭＩＤ：２２４７４６１５）を参照のこと。

【０２５９】

別の実施形態において、自己抗原は、がんと関連する。がん抗原の代表的なタイプとしては、以下が挙げられる：例えば、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＣＥＡ、チロシナーゼ、ミッドカイン、ＢＡＧＥ、ＣＡＳＰ－８、β－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ＣＡ－１２５、ＣＤＫ－１、ＣＤＫ４、ＥＳＯ－１、ｇｐ７５、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１、ＭＵＣ－１、ＭＵＭ－１、ｐ５３、ＰＡＰ、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ｒａｓ、ｔｒｐ－１、ＨＥＲ－２、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＩＬ１３Ｒα、ＩＬ１３Ｒα２、ＡＩＭ－２、ＡＩＭ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｃ９ｏｒｆ １１２、ＳＡＲＴ１、ＳＡＲＴ２、ＳＡＲＴ３、ＢＲＡＰ、ＲＴＮ４、ＧＬＥＡ２、ＴＮＫＳ２、ＫＩＡＡ０３７６、ＩＮＧ４、ＨＳＰＨ１、Ｃ１３ｏｒｆ２４、ＲＢＰＳＵＨ、Ｃ６ｏｒｆ１５３、ＮＫＴＲ、ＮＳＥＰ１、Ｕ２ＡＦ１Ｌ、ＣＹＮＬ２、ＴＰＲ、ＳＯＸ２、ＧＯＬＧＡ、ＢＭＩ１、ＣＯＸ－２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＺＨ２、ＬＩＣＡＭ、Ｌｉｖｉｎ、Ｌｉｖｉｎβ、ＭＲＰ－３、ネスチン、ＯＬＩＧ２、ＡＲＴ１、ＡＲＴ４、Ｂ－サイクリン、Ｇｌｉ１、Ｃａｖ－１、カテプシンＢ、ＣＤ７４、Ｅ－カドヘリン、ＥｐｈＡ２／Ｅｃｋ、Ｆｒａ－１／Ｆｏｓｌ １、ＧＡＧＥ－１、ガングリオシド／ＧＤ２、ＧｎＴ－Ｖ、β１，６－Ｎ、Ｋｉ６７、Ｋｕ７０／８０、ＰＲＯＸ１、ＰＳＣＡ、ＳＯＸ１０、ＳＯＸ１１、サバイビン、ＵＰＡＲ、ＷＴ－１、ジペプチジルペプチダーゼ ＩＶ（ＤＰＰＩＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤ Ａｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸関連抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、Ｔ細胞レセプター／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－Ｉ、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＲＣＡＳｌ、α－フェトプロテイン、ｐｌ２０ｃｔｎ、Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、脳型グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－Ｉ、ＣＴ－７、ｃｄｃ２７、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、ＰｌＡ、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐｌ５、ＧＭ２、ＧＤ２ガングリオシド、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、ｌｍｐ－１、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－Ｉ、ＵＬ１６結合タンパク質様転写物１（Ｍｕｌｔ１）、ＲＡＥ－１タンパク質、Ｈ６０、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、およびｃ－ｅｒｂＢ－２、またはこれらの免疫原性ペプチド、ならびにこれらの組み合わせ。

【０２６０】

別の実施形態において、抗原は、改変されたＴ細胞、例えば、上記で記載されるＣＡＲＴ細胞の標的である。このような実施形態において、その抗原は、ＣＤ１９またはそのフラグメントまたはその改変体である。別の実施形態において、その抗原は、ＣＤ２２またはそのフラグメントまたはその改変体である。

【０２６１】

前述の抗原は、任意の公知の方法（共有結合的および非共有結合的な相互作用を含む）を使用して、足場組成物と組み合わされ得る。これらの方法のうちのいくつかは、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を本発明の機能的分子とともに製作することに関連する節において、上記で概説されている。非共有結合的な相互作用の例としては、例えば、静電的相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、π効果、疎水性相互作用、物理的挿入などが挙げられる。例えば、全長膜貫通タンパク質抗原は、慣用的方法を使用する物理的挿入を介して、脂質二重層の中に組み込まれ得る。Ｃｙｍｅｒら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４２７．５：９９９－１０２２，２０１５および米国特許第７，５６９，８５０号（これらは、本明細書で参考として援用される）を参照のこと。

【０２６２】

抗原はまた、共有結合的な相互作用を介して、足場組成物に付着され得るかまたはテザーで繋がれ得る。抗原を足場／表面に付着させるための方法は、当該分野で公知である（例えば、表面吸着、例えば、足場材料の中に物質を捕捉するための相変化を使用する物理的固定化）。あるいは、アルキル化剤またはアシル化剤を介する共有結合的なカップリングは、規定されたコンホメーションにおいて足場上に抗原の安定な長期の提示を提供するために使用され得る。ペプチド／タンパク質をポリマーに共有結合的にカップリングするための例示的な試薬および方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第６，００１，３９５号（これは、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。他の実施形態において、抗原は、足場の中に被包される。抗原を適切な足場（例えば、ＰＬＧＡマイクロスフェア）の中に被包するための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第６，９１３，７６７号および国際公開番号ＷＯ １９９５／０１１０１０（これらの各々の開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０２６３】

抗原は、直接的結合または間接的結合を介して、免疫細胞と相互作用するように製剤化され得る。直接的結合のタイプとしては、例えば、抗原とコグネートレセプター（例えば、Ｔ細胞レセプター）とのエンゲージメントまたはカップリングが挙げられる。間接的結合は、１種またはこれより多くの二次的薬剤または細胞タイプの仲介を通じて起こり得る。例えば、その抗原は、Ｂ細胞または抗原提示細胞（ＡＰＣ）に先ず結合され得、プロセシングされ得（例えば、分解され得）、細胞表面主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）（これに対して標的細胞集団（例えば、Ｔ細胞）が結合する）上に提示され得る。あるいは、その抗原は、種々のサイトカイン、増殖因子、ケモカインなどを分泌する他の仲介細胞を動員し得、これは翻って、標的免疫細胞集団を誘引する。機構が何であろうと、その動員された構成要素は、免疫細胞を操作または改変するために協働して作用する。

【０２６４】

抗原は、細胞溶解物、分画された細胞溶解物、新鮮に採取された細胞、生物学的流体（血液、血清、腹水が挙げられる）、組織抽出物などに由来し得る。一実施形態において、抗原は、所望の免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）が結合する標的細胞の溶解物に由来する。これらの実施形態において、その抗原は、足場に負荷する前に、その細胞溶解物において先ず分画される。その溶解物は、所望の標的組織（例えば、初代組織から得られた自己免疫疾患特異的細胞）に由来し得る。あるいは、その溶解物は、がん細胞（例えば、腫瘍サンプルもしくは組織培養物から得られる個々の細胞、または生検組織構造から得られる腫瘍細胞）に由来し得る。

【０２６５】

本発明の足場はまた、１種またはこれより多くの動員薬剤を含み得る。その動員薬剤は、Ｔ細胞動員薬剤、Ｂ細胞動員薬剤、樹状細胞動員薬剤、およびマクロファージ動員薬剤からなる群より選択される薬剤であり得る。

【０２６６】

一実施形態において、足場は、Ｔ細胞動員薬剤を含む。Ｔ細胞動員薬剤の非限定的な例としては、例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２１（ＣＣＬ－２１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リ

ガンド１９（ＣＣＬ－１９）、またはＦＭＳ様チロシンキナーゼ３（Ｆｌｔ－３）リガンド、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、ＩＦＮγ、ＣＸＣＬ１２およびＣＸＣＲ４からなる群より選択されるＣ－Ｘ－Ｃモチーフケモカインリガンド（ＣＸＣＬ）、またはこれらのフラグメント、これらの改変体、またはこれらの組み合わせが挙げられる。他のタイプのＴ細胞動員薬剤としては、Ｔヘルパータイプ１（Ｔｈ１）部分セットを動員するためのＣＣＲ５およびＣＸＣＲ３レセプターのリガンドが挙げられる。ＣＣＲ５リガンド、ＣＣＬ５およびマクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ－１α）は、公知である。あるいは、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ８およびＣＸＣＲ４のリガンドは、Ｔｈ２部分セットの特異的動員のために使用され得る。リガンドの組み合わせもまた、使用され得る。

【０２６７】

前述のＴ細胞動員薬剤の種々のホモログ（これらの機能的フラグメント、またはこれらの改変体が挙げられる）は、当該分野で公知である。ホモログの代表的な例としては、ハエ、マウス、ラット、ブタ、ウシ、サル、ヒトなどに由来する関連タンパク質が挙げられる。そのホモログは、好ましくは、前述の動員薬剤のうちのヒトまたはマウスのホモログを含む。

【０２６８】

本発明の足場は、細胞の単一のタイプまたは単一のサブタイプの優先的な動員（例えば、Ｔ細胞の、および特に、Ｔｒｅｇ細胞またはＮＫ細胞の部分セットの優先的な動員）のために適合される。優先的な動員は、デバイスにおける（または動員薬剤を欠くコントロール足場における）免疫細胞の他のタイプと比較して、デバイスにおける免疫細胞の特定のタイプ（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＤＣ／マクロファージ）のうち１種またはこれより多くにおいて、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも１００％、少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも８倍、少なくとも１０倍、またはこれより多くの増大の蓄積によって特徴づけられる。免疫細胞の組み合わせ（例えば、Ｔ細胞およびＤＣ／マクロファージの組み合わせ）を動員するように適合された足場において、優先的な動員は、動員された細胞の全てのパーセンテージが、デバイス（またはコントロール足場における）免疫細胞の他のタイプより少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも１００％、少なくとも２倍（すなわち、２００％）、少なくとも５倍、少なくとも８倍、少なくとも１０倍、またはこれより多い場合に特徴づけられる。特に、優先的な動員は、他の免疫細胞と比較して、目的の細胞の数の１～１０倍の増大によって特徴づけられる。

【０２６９】

一実施形態において、本発明は、ＧＭ－ＣＳＦ、そのアゴニスト、その模倣物、そのフラグメント、その改変体、またはこれらの組み合わせである動員薬剤をさらに含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。好ましくは、その動員薬剤は、ＣＣＬ－２１、ＣＣＬ－１９、Ｆｌｔ－３またはＧＣＳＦのうちの少なくとも１種との組み合わせにおけるＧＭ－ＣＳＦである。このような動員薬剤の代表的な例としては、例えば、ヒトＧＭ－ＣＳＦ（ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０００７４９．２）およびマウスＧＭ－ＣＳＦ（ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０３４０９９．２）が挙げられる。別の実施形態において、本発明は、ＧＭ－ＣＳＦのフラグメント（例えば、ｈＧＭ－ＣＳＦ配列のアミノ酸１８～１４４を含むポリペプチド）を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。さらに別の実施形態において、本発明は、ＧＭ－ＣＳＦ改変体（例えば、ＶＡＲ＿０１３０８９およびＶＡＲ＿００１９７５が挙げられ、これらの配列は、ＵＮＩＰＲＯＴに受け入れられている（アクセッション番号Ｐ０４１４１））を含む足場に関する。別の実施形態において、本発明は、ＧＭ－ＣＳＦ模倣物（例えば、ＧＭ－ＣＳＦレセプターに結合する抗体、例えば、Ｍｏｎｆａｒｄｉｎｉら，Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｄｅｓ．，８（２４）：２１８５－９９，２００２によって記載されるものが挙げられる）を含むＭＳＲ－ＳＬＢ足場に関する。

【０２７０】

本発明の実施形態はさらに、複数のさらなる薬剤を含む、免疫細胞を操作するための足

場を提供する。このような実施形態において、そのさらなる薬剤は、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、接着シグナル伝達分子、インテグリンシグナル伝達分子またはこれらのフラグメントまたはこれらの組み合わせを含み得る。

【０２７１】

増殖因子／サイトカインの代表的な例としては、アドレノメジュリン（ＡＭ）、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、自己分泌型細胞運動刺激因子（ａｕｔｏｃｒｉｎｅ　ｍｏｔｉｌｉｔｙ　ｆａｃｔｏｒ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、ウシ胎仔ソマトトロフィン（ｆｏｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｏｍａｔｏｔｒｏｐｈｉｎ）（ＦＢＳ）、グリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、増殖分化因子－９（ＧＤＦ９）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、肝がん由来増殖因子（ＨＤＧＦ）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ）、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、移動刺激因子（ｍｉｇｒａｔｉｏｎ－ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ）（ＭＳＦ）、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）、神経増殖因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、Ｔ細胞増殖因子（ＴＣＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ－αまたはＴＧＦ－β）、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、Ｗｎｔ、胎盤増殖因子（ＰＧＦ）、またはこれらの機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７２】

インターロイキンの代表的なタイプとしては、ＩＬ－１（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、およびマクロファージを活性化する）、ＩＬ－２（Ｂ細胞およびＮＫ細胞を活性化する）、ＩＬ－３（非リンパ系細胞を刺激する）、ＩＬ－４（活性化Ｂ細胞、静止Ｔ細胞、およびマスト細胞の増殖因子）、ＩＬ－５（活性化Ｂ細胞の分化のため）、ＩＬ－６（形質細胞およびＴ細胞の増殖因子）、ＩＬ－７（プレＢ細胞／プレＴ細胞およびＮＫ細胞の増殖因子）、ＩＬ－１０（マクロファージ、Ｂ細胞、マスト細胞、Ｔｈ１／Ｔｈ２細胞を活性化する）、ＩＬ－１２（Ｔ細胞およびＮＫ細胞を活性化する）、ＩＬ－１７（Ｔｈ細胞を活性化する）が挙げられるが、これらに限定されない。インターロイキンの機能的フラグメント（これらは、標的細胞の活性を調節するそれらの能力によって特徴づけられる）がまた、使用され得る。

【０２７３】

必要に応じて、足場は、接着分子を含み得、これは、シグナル伝達因子としても働き得る。接着シグナル伝達分子の代表的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、トロンボスポンディン１、ビトロネクチン、エラスチン、テネイシン、アグリカン、アグリン、骨シアロタンパク質、軟骨マトリクスタンパク質、フィブリノゲン、フィブリン（ｆｉｂｒｉｎ）、ファイブリン（ｆｉｂｕｌｉｎ）、ムチン、エンタクチン、オステオポンチン、プラスミノゲン、レストリクチン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｎ）、セルグリシン（ｓｅｒｇｌｙｃｉｎ）、ＳＰＡＲＣ／オステオネクチン、ベルシカン（ｖｅｒｓｉｃａｎ）、フォン・ヴィレブランド因子、ポリサッカリドヘパリン硫酸、コネキシン、コラーゲン、ＲＧＤ（Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ）およびＹＩＧＳＲ（Ｔｙｒ－Ｉｌｅ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ａｒｇ）ペプチド、ならびに環状ペプチド、グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、コンドロイチン－６－硫酸、インテグリンリガンド、セレクチン、カドヘリンならびに免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー。他の例としては、神経系細胞接着分子（ＮＣＡＭ）、細胞内接着分子（ＩＣＡＭ）、血管細胞接着分子（ＶＣＡＭ－１）、血小板－内皮細胞接着分子（ＰＥＣＡＭ－１）、Ｌ１、およびＣＨＬ１が挙げられる。接着分子の機能的フラグメント（これは、本発明の足場への標的細胞の結合を調節するそれらの能力によって特徴づけられる）がまた、使用され得る。特に、接着分子は、アミノ酸配列アルギニン－グリシン－アスパラギン酸（ＲＧＤ）（これは、細胞付着リガンドとして公知であり、種々の天

然の細胞外マトリクス分子において見出される）を含むペプチドまたは環状ペプチドを含む。別の実施形態において、接着ペプチドは、コラーゲン模倣物である。代表的な例としては、構造ＧＧＹＧＧＧＰＣ（ＧＰＰ）５ＧＦＯＧＥＲ（ＧＰＰ）５ＧＰＣ（ここでＯは、ヒドロキシプロリンである）を有するペプチドが挙げられる。このようなペプチドは、ＧＦＯＧＥＲペプチドとまとめて言及され得る。ＧＦＯＧＥＲペプチドは、Ｔ細胞接着に関して特に良好であることが以前に示されている。Ｓｔｅｐｈａｎら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３３，　２０１５を参照のこと。

【０２７４】

このような改変を有するポリマーマトリクスは、本発明の足場に対する細胞接着特性を提供し、哺乳動物細胞系の長期間の生存、ならびに細胞増殖および分化の支持を維持する。接着分子は、当業者に一般に公知であり、実施例に記載される合成法を使用して達成されるポリマーマトリクスにカップリングされ得る。例えば、Ｈｉｒａｎｏら，　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，　１７－２５，　２００４；　Ｈｅｒｍａｎｓｏｎら，　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　ｐ．　１５２－１８５，　１９９６；　Ｍａｓｓｉａ　ａｎｄ　Ｈｕｂｂｅｌｌ，　Ｊ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　１１４：１０８９－１１００，　１９９１；　Ｍｏｏｎｅｙら，　Ｊ．　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓ．　１５１：４９７－５０５，　１９９２；およびＨａｎｓｅｎら，　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｅｌｌ　５：９６７－９７５，　１９９４（これらにおける開示は、参考として援用される）を参照のこと。

【０２７５】

標的細胞タイプに依存して、標的細胞に対して特異的な接着シグナル伝達分子を使用することは、好ましいことであり得る。従って、一実施形態において、足場は、Ｔ細胞の結合／隔離において有用な接着レセプターを含む。これらの実施形態において、足場は、Ｔ細胞特異的接着分子（例えば、ＭＨＣクラスＩＩ（ＣＤ４＋　細胞に関して）、ＭＨＣクラスＩ（ＣＤ８＋　細胞に関して）、ＬＦＡ－３（ＣＤ２リガンド）、ＩＣＡＭ１（ＬＦＡ－１のリガンド）またはこれらの改変体、これらのフラグメントまたはこれらの組み合わせからなる群より選択されるレセプター）を含み得る。

【０２７６】

必要性に依存して、足場は、免疫細胞の特定の部分セット（例えば、Ｔ細胞の特定の部分集団）を操作するために、動員薬剤および接着分子の部分セットを含むように特異的に製剤化され得る。これらの実施形態において、その足場は、標的細胞において発現される細胞表面マーカーに特異的に結合する薬剤を使用して、製剤化／製作され得る。例えば、Ｔ細胞の状況において、足場は、ヘルパーＴ細胞（$Ｔ_{Ｈ}$細胞；これは、ＣＤ４＋を差次的に発現する）、細胞傷害性Ｔ細胞（$Ｔ_{ｃ}$細胞；これは、ＣＤ８＋を差次的に発現する）、メモリーＴ細胞（$Ｔ_{ｍ}$細胞；これは、ＣＤ４５ＲＯを差次的に発現する）、サプレッサーＴ細胞（$Ｔ_{ｓ}$細胞）、調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇｓ；ＦＯＸＰ３＋　Ｔｒｅｇ細胞およびＦＯＸＰ３－　Ｔｒｅｇとしてさらに特徴づけられる）、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫ細胞；ＣＤ１ｄ＋を差次的に発現する）、粘膜関連インバリアント（ＭＡＩＴ；ＭＲ１を差次的に発現する）、ガンマデルタＴ細胞（γδ　Ｔ細胞；１つのγ鎖および１つのδ鎖を含むＴＣＲを含む）の優先的な動員のために適合され得る。細胞表面マーカーに結合するこのような薬剤としては、例えば、ハプテン、ペプチド、リガンド、抗体などが挙げられ得る。１種またはこれより多くの細胞サブタイプを有する単離物を富化するための他の慣用的技術は、インサイチュでまたはエクスサイチュで必要に応じて使用され得る。

【０２７７】

足場はまた、疾患に特異的である免疫細胞を動員するために適合され得る。例えば、自己免疫疾患の特定のタイプに対して特異的な複数のＴ細胞が動員され得る。従って、一実施形態において、自己免疫障害の診断において有用な足場は、その障害に関わる免疫細胞に特異的な動員薬剤を含むように製剤化され得る。このような動員薬剤は、例えば、調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、サプレッサーＴ細胞（Ｔｓ）またはこれらの組み合わせに特異的であり得る。関連する実施形態において、がんの診断において有用な足場は、がん特異的

なＴ細胞タイプ、例えば、細胞傷害性Ｔ細胞（Ｔｃ）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）またはこれらの組み合わせを優先的に動員するための動員薬剤を含むように製剤化され得る。

【０２７８】

ある種の実施形態において、足場は、疾患特異的細胞をパニング（ｐａｎ　ｆｏｒ）するために有用である。このようなものとしては、例えば、疾患進行を直接的に促進する細胞が挙げられ得る。多くの自己免疫疾患の状況では、その疾患は、細胞の特定の集団、例えば、Ｔ１Ｄにおいては膵臓のβ細胞および多発性硬化症においてはニューロン細胞の標的化された殺滅を介して媒介および促進され得る。他の自己免疫疾患では、その疾患は、関節リウマチの状況では、例えば、リウマチ因子（ＲＦ）およびシトルリン化ペプチド（ＡＣＰＡ）のような特異的エピトープ、ならびにクローン病の状況では、腸内細菌叢に存在する抗原の標的化された攻撃によって促進され得る。細胞の標的化された破壊は、一般に、免疫細胞の特異的タイプまたは部分セットを必要とする。従って、細胞標的の性質および特性に基づいて、これらに特異的な免疫細胞は、本発明の足場を使用して優先的に操作され得る。

【０２７９】

前述の実施形態において、足場は、疾患特異的免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）が結合する抗原とともに提供される。これらの自己免疫細胞は、非自己免疫表現型へと操作および必要に応じて再プログラムされ得る。Ｔ細胞を多能性へと再プログラムするための方法は、当該分野で公知である。Ｎｉｓｈｉｍｕｒａら，　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　１２，　１１４－１２６（２０１３）；　Ｔｈｅｍｅｌｉら，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３１，　９２８－９３３（２０１３）を参照のこと。ある種の場合では、特に、がん特異的Ｔ細胞の状況では、その再プログラムされた細胞は、がんを標的化するために若返らせられ得る。あるいは、自己免疫疾患に特異的なＴ細胞の状況では、その細胞は、排除され得る。

【０２８０】

ある種の実施形態において、本発明の足場は、抗原提示を維持するように操作された多孔性構造として製作される。多孔性足場を製作するための方法は、当該分野で記載されている。例えば、米国公開番号２０１１／００２０２１６、同第２０１３／０２０２７０７、同第２０１１／００２０２１６および米国特許第８，０６７，２３７号（これらにおける開示は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

【０２８１】

本発明の実施形態はさらに、種々のエキソビボおよびインビボ適用のために望ましい安定性を有するＭＳＲ－ＳＬＢ足場を含む足場を提供する。例えば、その足場は、組織培養適用、細胞成長実験において、または組織（採取もしくは操作された）そしてまた被験体へと投与されるべき移植用材料として安定である。一実施形態において、本発明は、少なくとも０．５日間、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、４５日間、５０日間、または５０日間超にわたって、連続流体体系を保持するメソポーラスシリカマイクロロッド－脂質二重層（ＭＳＲ－ＳＬＢ）足場に関する。足場の安定性および／または流体体系は、慣用的技術（例えば、以下の実施例で例証される顕微鏡による可視化技術）を使用してモニターされ得る。

【０２８２】

ＩＩ．本発明の足場を作製するための方法

本発明の実施形態はさらに、本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を作製するための方法に関する。上記方法は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層を提供する工程；Ｔ細胞ホメオスタシス因子をＭＳＲ上に必要に応じて負荷する工程；連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を、上記ＭＳＲを含む基部層上に層化する工程であって、それによってＭＳＲ－ＳＬＢ足場を生成する工程；工程（ｂ）が行わ

れない場合、Ｔ細胞ホメオスタシス因子を上記ＭＳＲ－ＳＬＢ足場上に負荷する工程；ＭＳＲ－ＳＬＢ足場における１種またはこれより多くの非特異的相互作用を遮断因子で必要に応じて遮断する工程；およびＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場上に負荷する工程であって、それによってＡＰＣ－ＭＳを作製する工程を包含する。これらの実施形態において、その方法は、増殖因子、サイトカイン、インターロイキン、接着シグナル伝達分子、インテグリンシグナル伝達分子、またはこれらのフラグメントまたはこれらの組み合わせである少なくとも１種のさらなる薬剤を、足場の中にさらに負荷する工程を包含し得る。そのさらなる成分を負荷するための方法は、デバイス製作の節において先に記載されている。本発明の足場を作製するための代表的な方法は、図２４に提供される。

【０２８３】

一実施形態において、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子（例えば、抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体）の１：１混合物を含む機能的分子の混合物は、機能的分子：ＭＳＲ－ＳＬＢ足場の重量比が約１：２～約１：２０の間、好ましくは約１：４～約１：１５の間、特に、約１：５～約１：１０の間であるように、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場と組み合わせられる。Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子の重量比は、機能的分子とＭＳＲ－ＳＬＢ足場との間の同じ乾燥重量比を保持しながら、例えば、約５：１～約１：５の間に調節され得る。

【０２８４】

さらに、本発明の実施形態はさらに、複数の足場をアセンブリして、Ｔ細胞、より具体的には、ヘルパーＴ細胞または細胞傷害性Ｔ細胞の別個の部分集団の浸潤を可能にするために十分な多孔性を有する積み重ねを生成することによって、ＡＰＣ－ＭＳを作製するための方法に関する。

【０２８５】

ＩＩＩ．本発明の足場を使用するための方法

本発明の足場は、種々の適用（標的エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞の操作、エフェクター細胞の特定の集団（例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞の部分集団）の単離、疾患の診断および治療、ならびに疾患の診断および治療のための組成物およびキットの生成が挙げられるが、これらに限定されない）のために使用され得る。

【０２８６】

標的細胞を操作するための方法

一実施形態において、本発明は、標的エフェクター細胞またはその部分集団（例えば、ヘルパーＴ細胞または細胞傷害性Ｔ細胞）を操作するための方法を提供する。この状況では、用語「操作（ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ）」とは、標的エフェクター細胞の例えば、活性化、分裂、分化、成長、拡大、再プログラミング、アネルギー、静止、老化、アポトーシスまたは死滅を含む。

【０２８７】

一実施形態において、標的エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞）は、その標的エフェクター細胞が足場と接触した状態になるように本発明の足場を提供することによって、インサイチュで操作（例えば、活性化）される。接触を促進するために、足場は、被験体において適切な部位に、例えば、皮下にまたは静脈内に、移植され得る。他の実施形態において、標的細胞は、標的エフェクター細胞を含むサンプルを本発明の足場とともに培養することによって、エキソビボで操作される。

【０２８８】

被験体から与えられる新鮮なサンプル、初代培養細胞、不死化細胞、細胞株、ハイブリドーマなどを含む、種々の標的エフェクター細胞が、操作され得る。その操作された細胞は、種々の免疫療法的適用および研究のために使用され得る。

【０２８９】

標的エフェクター細胞の操作の部位は、インサイチュであってもエキソサイチュであってもよい。従って、一実施形態において、細胞は、インサイチュで（例えば、足場内で）

操作される。この状況では、細胞は、操作されるべき足場から物理的に除去される必要はない。別の実施形態において、細胞は、エキソサイチュで（例えば、足場から細胞を先ず除去し、そしてその除去された細胞を操作することによって）操作される。足場が被験体に移植される場合、細胞は、移植部位においてまたはその付近において操作され得る。他の実施形態において、その移植された足場は、移植部位から先ず除去され得、そのエフェクター細胞は、先に記載されるように、インサイチュまたはエキソサイチュで操作され得る。

【０２９０】

ある種の実施形態において、エフェクター細胞を操作するにあたって使用される足場は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）および／またはこのようなＡＰＣに由来する種々の抗原とともに提供され得る。これらの二次的な薬剤（例えば、ＡＰＣまたはＡＰＣに由来する抗原）は、足場構造において提供されてもよいし、外因的に、例えば、培養培地において提供されてもよい。ある種の実施形態において、足場は、ＡＰＣを誘引および／または動員する種々の抗原とともに提供され得る。このような誘引および／または動員する分子の代表的な例は、先の節において提供されている。

【０２９１】

ある種の実施形態において、抗原含有足場は、標的エフェクター細胞をインビボで操作するために使用され得る。このような適用のために、その足場は、標的エフェクター細胞が足場と接触した状態になるように、血管の内部、リンパ組織の中、腫瘍部位に、疾患部位（例えば、関節リウマチによって影響をうけた組織の周りの領域）に、または皮下に移植され得る。あるいは、その足場は、最小限に侵襲性の様式で、例えば、針、カテーテルなどを介して注射され得る。その移植された足場は、約０．５日間、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、１週間、２週間、３週間、４週間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、６ヶ月間、７ヶ月間、８ヶ月間、９ヶ月間、１年、２年、またはこれより長く移植部位において保持することを可能にされ得る。周期的に、その足場は、エフェクター細胞を研究、分析、またはさらになお操作するために外植され得る。

【０２９２】

関連する実施形態において、本発明は、抗原特異的エフェクター細胞のインサイチュでの操作に関する。この状況では、本発明の足場は、機能的分子を吸着するための同じストラテジーを使用して、足場上に吸着された目的の抗原を含み得る。あるいは、本発明の足場は、目的の抗原を提示するＡＰＣと一緒に、培養培地中に抗原特異的エフェクターＴ細胞を含むサンプルとともにインキュベートされ得る。次いで、その標的エフェクター細胞は、足場と接触した状態にさせられ、その足場に含まれる機能的分子は、エフェクター細胞の操作を促進するために一緒に作用する。純粋に代表的実施形態として、実施例の節に記載されるように、Ｔ細胞を含むサンプルは、本発明の足場とともにインキュベートされ、これは、その標的エフェクター細胞を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する。そのサンプルは、約１日間～３０日間、約１～１５日間または約４～１３日間、例えば、約７～８日間、足場とともにインキュベートされ得、エフェクター細胞集団の選択的操作を生じる。その抗原特異的エフェクター細胞は、ある種の遺伝子生成物（例えば、抗原または目的の抗原提示細胞を認識するＴ細胞レセプター（ＴＣＲ））の発現に基づいて細胞を選択することによって、さらに操作され得る。

【０２９３】

本明細書で記載される実施形態はさらに、抗原特異的エフェクター細胞をエキソサイチュで操作するための方法に関し、ここで足場は、目的の抗原を発現するＡＰＣまたはその抗原自体とともに提供される。操作工程は、エキソサイチュまたはインサイチュで行われ得る。

【０２９４】

別の実施形態において、抗原またはＡＰＣに対して特異的なエフェクター標的細胞は、他のエフェクター細胞より選択的に操作され得る（例えば、ＣＤ４＋　Ｔ細胞よりＣＤ８＋　Ｔ細胞が好まれる）。例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞を（ＣＤ４＋　Ｔ細胞とともに）含

むサンプルは、ＣＤ８＋　Ｔ細胞の浸潤および／または隔離を可能にするように機械的にまたは化学的に製作された本発明の足場とともにインキュベートされ得る。その浸潤および／または隔離されたＣＤ８＋　Ｔ細胞はさらに、当該分野で公知の技術を使用して、拡大、活性化、増殖、または成長され得る。代表的な方法は、先に記載されている。

【０２９５】

別の実施形態において、抗原またはＡＰＣに対して特異的なエフェクター標的細胞は、望まれていないもの（例えば、調節性／サプレッサーＴ細胞）でもよく、それらは、本発明の足場との接触後に、アポトーシス、アネルギーまたは死滅を受けるように誘導される。例えば、調節性Ｔ細胞を（他のＴ細胞とともに）含むサンプルは、調節性／サプレッサーＴ細胞の浸潤および／または隔離を可能にするように機械的にまたは化学的に製作された本発明の足場とともにインキュベートされ得る。その浸潤および／または隔離されたＴ細胞は、当該分野で公知の技術を使用して排除され得る。

【０２９６】

この状況では、本発明の足場において浸潤および／または隔離された細胞が何であるかは、当該分野で公知の技術を使用してさらに決定され得る。従って、一実施形態において、活性化Ｔ細胞を同定または選択するための遺伝子生成物は、細胞表面マーカーまたはサイトカイン、またはこれらの組み合わせであり得る。活性化Ｔ細胞を同定するための細胞表面マーカーとしては、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ２８、およびＣＤ１３４が挙げられるが、これらに限定されない。ＣＤ６９は、ＢおよびＴリンパ球、ＮＫ細胞、ならびに顆粒球上で見出される初期活性化マーカーである。ＣＤ２５は、ＩＬ－２レセプターであり、活性化Ｔ細胞およびＢ細胞のマーカーである。ＣＤ４は、ＴＣＲ補助レセプターであり、胸腺細胞（ｔｈｙｍｏｃｔｅ）、ＴＨ１タイプおよびＴＨ２タイプのＴ細胞、単球、ならびにマクロファージのマーカーである。ＣＤ８はまた、ＴＣＲ補助レセプターであり、細胞傷害性Ｔ細胞のマーカーである。ＣＤ１３４は、活性化ＣＤ４＋　Ｔ細胞においてのみ発現される。

【０２９７】

活性化Ｔ細胞を選択するための細胞表面マーカーとしては、ＣＤ３６、ＣＤ４０、およびＣＤ４４が挙げられるが、これらに限定されない。ＣＤ２８は、Ｔ細胞レセプター経路とは独立した刺激性Ｔ細胞活性化経路として作用し、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　細胞上で発現される。ＣＤ３６は、膜糖タンパク質であり、血小板、単球および内皮細胞のマーカーである。ＣＤ４０は、Ｂ細胞、マクロファージおよび樹状細胞のマーカーである。ＣＤ４４は、マクロファージおよび他の食細胞のマーカーである。Ｔ細胞の部分セットは、ヘルパーＴ細胞または細胞傷害性Ｔ細胞の細胞表面遺伝子生成物の発現に関して正の選択、負の選択、またはこれらの組み合わせを使用することによって単離され得る（例えば、ＣＤ４　対　ＣＤ８）。本発明の活性化Ｔ細胞を同定するためのサイトカインとしては、ＴＨ１タイプＴ細胞（細胞媒介性応答）およびＴＨ２タイプＴ細胞（抗体応答）によって生成されるサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。活性化ＴＨ１タイプＴ細胞を同定するためのサイトカインとしては、ＩＬ－２、γインターフェロン（γＩＦＮ）および組織壊死因子α（ＴＮＦα）が挙げられるが、これらに限定されない。活性化ＴＨ２タイプＴ細胞を同定するためのサイトカインとしては、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０およびＩＬ－１３が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ細胞の部分セットはまた、ヘルパーＴ細胞または細胞傷害性Ｔ細胞のサイトカイン遺伝子生成物の発現に関して正の選択、負の選択、またはこれらの組み合わせを使用することによって単離され得る（例えば、γＩＦＮ　対　ＩＬ４）。

【０２９８】

目的の抗原に対して特異的な活性化ＴＨ１タイプＴ細胞は、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ２５、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、またはこれらの組み合わせを発現する細胞を同定することによって単離され得る。目的の抗原に対して特異的な活性化ＴＨ１タイプＴ細胞はまた、ＣＤ６９およびＣＤ４を、ＩＦＮγまたはＴＮＦαと一緒に発現する細胞を同定することによって単離され得る。目的の抗原に対して特異的な活性化ＴＨ２タイプＴ細胞は

、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせを発現する細胞を同定することによって単離され得る。目的の抗原に対して特異的な活性化ＴＨ１タイプＴ細胞およびＴＨ２タイプＴ細胞の組み合わせは、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ２５、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、またはこれらの組み合わせを発現する細胞、およびＣＤ６９、ＣＤ４、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせを発現する細胞を同定することによって単離され得る。

【０２９９】

本発明の活性化Ｔ細胞の正の選択または負の選択に使用される遺伝子生成物は、抗体を利用する当業者に公知の免疫選択技術（蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）、磁性セルソーティング、パニング、およびクロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない）によって同定され得る。活性化Ｔ細胞上の２種またはこれより多くのマーカーの免疫選択は、１またはこれより多くの工程において行われ得、ここで各工程は、１種またはこれより多くのマーカーを正にまたは負に選択する。２種またはこれより多くのマーカーの免疫選択が、ＦＡＣＳを使用して１工程で行われる場合、２種またはこれより多くの異なる抗体が、異なる発蛍光団で標識され得る。あるいは、上記のように、細胞は、マイクロビーズを使用してソートされ得る。

【０３００】

細胞表面に発現される遺伝子生成物に関して、抗体は、その遺伝子生成物に直接的に結合し得、細胞選択のために使用され得る。低濃度で発現される細胞表面遺伝子生成物に関しては、磁性蛍光リポソームが、細胞選択のために使用され得る。低レベルの発現では、従来の蛍光標識抗体は、細胞表面に発現される遺伝子生成物の存在を検出するために十分感度が高くない可能性がある。発蛍光団含有リポソームは、目的の特異性を有する抗体に結合体化され得、それによって、細胞表面マーカーの検出を可能にする。

【０３０１】

細胞内遺伝子生成物（例えば、サイトカイン）に関しては、抗体は、細胞を透過性にした後に使用され得る。あるいは、透過性にすることによる細胞の殺滅を回避するために、細胞内遺伝子生成物は、その細胞から最終的に分泌される場合には、細胞表面上で「捕捉」抗体を使用して細胞膜を通じて分泌されるときに検出され得る。その捕捉抗体は、２種の異なる抗原：（ｉ）分泌された目的の遺伝子生成物および（ｉｉ）細胞表面タンパク質に対して特異的な二重抗体（ｄｏｕｂｌｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）であり得る。その細胞表面タンパク質は、概して、Ｔ細胞、特に、またはリンパ球上に存在する任意の表面マーカー（例えば、ＣＤ４５）であり得る。その捕捉抗体は、細胞表面タンパク質に先ず結合し得、次いで、膜を通って分泌されたときに目的の細胞内遺伝子生成物に結合し得、それによって、細胞表面上で遺伝子生成物を保持する。次いで、その捕捉された遺伝子生成物に対して特異的な標識抗体は、その捕捉された遺伝子生成物に結合するために使用され得、これは、活性化Ｔ細胞の選択を可能にする。ある種の形態のサイトカインはまた、細胞表面上で、低濃度で発現されることが見出される。例えば、γＩＦＮは、細胞内γＩＦＮ発現の動態に類似の動態で細胞表面上に低濃度で提示される（Ａｓｓｅｎｍａｃｈｅｒ，ら　Ｅｕｒ　Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ，　１９９６，　２６：２６３－２６７）。細胞表面上で発現されるサイトカインの形態に関しては、従来の蛍光標識抗体または発蛍光団含有リポソームが、目的のサイトカインを検出するために使用され得る。当業者は、活性化Ｔ細胞に対して特異的な細胞外および細胞内遺伝子生成物を検出および選択するための他の技術を認識する。

【０３０２】

本発明の方法によって単離されたＴ細胞は、全血から少なくとも４０％～９０％富化され得る。Ｔ細胞はまた、全血から少なくとも９５％富化され得る。そのＴ細胞はまた、全血から少なくとも９８％富化され得る。そのＴ細胞はまた、少なくとも９９．５％富化され得る。類似の方法が、Ｂ細胞のインサイチュまたはエキソサイチュでの操作において使用され得る。ある種の実施形態において、低温保存された細胞が融解され、本明細書で記載されるように洗浄され、活性化の前に室温において１時間静置させられる。

【０３０３】
適用に依存して、足場　対　細胞サンプルの乾燥重量比は、調節され得る。例えば、足場：細胞乾燥重量比は１：５００～５００：１の範囲に及び得、その間の任意の整数値は、エフェクター細胞を操作するために使用され得る。当業者が容易に認識し得るとおり、足場　対　細胞の比は、標的細胞に対する足場サイズに依存し得る。
【０３０４】
Ｔ細胞集団の拡大
関連する実施形態において、本発明はさらに、免疫細胞の集団からＴ細胞を拡大する、例えば、Ｂ細胞、樹状細胞、マクロファージ、形質細胞などを含むサンプル中に含まれるＴ細胞を拡大するための方法に関する。別の実施形態において、本発明はまた、Ｔ細胞の特定の集団を拡大する、例えば、ヘルパーＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、調節性／サプレッサーＴ細胞などを含むサンプルから、細胞傷害性Ｔ細胞を拡大するための方法に関する。Ｔ細胞の特定の部分集団は、下流で種々の免疫療法的適用において使用され得る。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、本発明のＡＰＣ－ＭＳは、Ｔ細胞の拡大のために特に有効であると考えられる。なぜならメソポーラスシリカロッドの比較的大きなサイズおよび高いアスペクト比は、各ロッドと相互作用するＴ細胞の大きなクラスターの形成を可能にし、このことは、Ｔ細胞／Ｔ細胞相互作用および／または傍分泌シグナル伝達を可能にすることによって、Ｔ細胞の効果的拡大を促進し得るからである。
【０３０５】
一実施形態において、標的エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞）は、その標的エフェクター細胞が足場と接触した状態になるように、本発明の足場を提供することによってインサイチュで拡大（例えば、成長または分化）される。接触を促進するために、その足場は、被験体において適切な部位に、例えば、皮下にまたは静脈内に移植され得る。他の実施形態において、その標的細胞は、標的エフェクター細胞を含むサンプルを本発明の足場とともに培養することによって、エキソビボで拡大される。一実施形態において、エキソビボでのＴ細胞拡大は、エフェクターＴ細胞が活性化され、共刺激され、そしてホメオスタシス的に維持されるように、サンプルからＴ細胞を先ず単離し、そして本発明の足場と接触させることによってＴ細胞をその後刺激することによって、行われ得る。
【０３０６】
本発明の一実施形態において、Ｔ細胞は、被験体から得られた初代Ｔ細胞である。用語「被験体（ｓｕｂｊｅｃｔ）」とは、免疫応答が誘起され得る生きている生物（例えば、哺乳動物）を含むことが意図される。被験体の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびこれらのトランスジェニック種が挙げられる。Ｔ細胞は、多くの供給源（末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位の組織、脾臓組織、および腫瘍が挙げられる）から得られ得る。本発明のある種の実施形態において、初代Ｔ細胞および／または当該分野で入手可能なＴ細胞株の任意の数が、使用され得る。
【０３０７】
全血計数に関する研究から、全血中のＴ細胞の数が非常に低いことが明らかである。例えば、Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，　Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，　ＢＣ，　ＣＡＮＡＤＡによって発行された製品カタログ（Ｄｏｃｕｍｅｎｔ　＃２３６２９，ＶＥＲＳＩＯＮ　２．１．０）によれば、全血中の白血球集団は、約０．１～０．２％であり（赤血球が優勢であることに起因する）、そのうち、Ｔ細胞は、白血球集団全体のうちの約７～２４％を構成する。Ｔ細胞の中では、ＣＤ４＋　Ｔ細胞は、白血球集団全体のうちの約４～２０％を構成し（全血における細胞集団全体のうちの０．０４％未満に解釈）、ＣＤ８＋　Ｔ細胞は、白血球集団全体のうちの約２～１１％を構成する（全血における細胞集団全体のうちの０．０２２％未満に解釈）。従って、本発明のある種の実施形態において、本発明の方法は、標的細胞の富化のための他の当該分野で公知の技術と合わされ得る。その富化工程は、サンプルと本発明の足場とを接触させる前に行われ得る。別の実施形態において、その富化工程は、サンプルを本発明の足場と接触させた後に行われ

得る。

【０３０８】

一実施形態において、エフェクター細胞集団は、ＦＩＣＯＬＬ分離を使用して富化され得る。一実施形態において、個体の循環血液に由来する細胞は、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシス（ｌｅｕｋａｐｈｅｒｅｓｉｓ）によって得られる。アフェレーシス生成物は、代表的にはＴ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含め、リンパ球を含む。アフェレーシスによって集められた細胞は、血漿画分を除去し、その後の処理工程のために適切な緩衝液または培地中に細胞を置くために洗浄され得る。次いで、その細胞は、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。あるいは、その洗浄溶液はカルシウムを欠き、そしてマグネシウムを欠いていてもよいし、全ての二価カチオンではないかもしれないが、多くを欠いていてもよい。半自動化「フロースルー（ｆｌｏｗ－ｔｈｒｏｕｇｈ）」遠心分離はまた、製造業者の説明書に従って使用され得る。洗浄後に、その細胞は、種々の生体適合性緩衝液（例えば、Ｃａ非含有、Ｍｇ非含有ＰＢＳのような）の中に再懸濁され得る。あるいは、アフェレーシスサンプルの望ましくない構成要素は、除去され得、細胞は、培養培地中に直接再懸濁され得る。

【０３０９】

別の実施形態において、末梢Ｔ細胞または全血Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、単球を、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ^{TM}勾配を通じた遠心分離によって枯渇させることによって富化され得る。Ｔ細胞の特定の部分集団（例えば、ＣＤ２８＋、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、ＣＤ４５ＲＡ＋、およびＣＤ４５ＲＯ＋Ｔ細胞）は、正の選択または負の選択の技術によってさらに単離され得る。

【０３１０】

本発明によれば、種々のソーティング技術が、必要に応じて使用され得る。例えば、拡大されたかまたは操作されたＴ細胞集団は、細胞に特有の表面マーカーに対して指向される抗体の組み合わせを使用してさらにソートされ得る。好ましい方法は、磁性免疫接着を介するセルソーティングおよび／もしくは選択であるか、または選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対して指向されるモノクローナル抗体のカクテルを使用するフローサイトメトリーである。例えば、ＣＤ４＋　細胞を負の選択によって富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、代表的には、ＣＤ１４、ＣＤ２０、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１６、ＨＬＡ－ＤＲ、およびＣＤ８に対する抗体を含む。ある種の実施形態において、ＣＤ４＋、ＣＤ２５＋、ＣＤ６２Ｌｈｉ、ＧＩＴＲ＋、およびＦｏｘＰ３＋を代表的には発現する調節性Ｔ細胞を富化するかまたは負の選択することは、望ましいことであり得る。

【０３１１】

細胞の望ましい集団を単離するために、細胞および足場表面の濃度は、変動され得る。ある種の実施形態において、細胞および足場の最大の接触を担保するために、容積をかなり低下させ、ここでその足場および細胞が一緒に混合される（すなわち、細胞の濃度を増大させる）ことは、望ましいことであり得る。例えば、一実施形態において、２０億個の細胞／ｍｌの濃度が使用される。一実施形態において、１０億個の細胞／ｍｌの濃度が使用される。さらなる実施形態において、１億個超の細胞／ｍｌが使用される。さらなる実施形態において、１０００万個、１５００万個、２０００万個、２５００万個、３０００万個、３５００万個、４０００万個、４５００万個、または５０００万個の細胞／ｍｌの細胞の濃度が、使用される。さらに別の実施形態において、７５００万個、８０００万個、８５００万個、９０００万個、９５００万個、または１億個の細胞／ｍｌの細胞の濃度が使用される。さらなる実施形態において、１億２５００万個または１億５０００万個の細胞／ｍｌの濃度が使用され得る。高濃度の使用は、増大した細胞収量、細胞活性化、および細胞拡大を生じ得る。さらに、高い細胞濃度を使用することで、目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞（例えば、ＣＤ２８陰性Ｔ細胞）の、または多くの腫瘍細胞が存在するサンプル（すなわち、白血病血液、腫瘍組織など）からの、より効率的な捕捉が可能になる。細胞のこのような集団は、治療上の価値を有し得、そして得るのが望ましい。例えば、高濃度の細胞を使用することは、より弱いＣＤ２８発現を通常有するＣＤ８＋　Ｔ細胞

のより効率的な選択を可能にする。

【０３１２】

関連する実施形態において、低濃度の細胞を使用することは、望ましいことであり得る。これは、足場：細胞比を低くすることによって達成され得、その結果、足場と細胞との間の相互作用は最小限にされる。この方法は、足場に結合されるべき多量の望ましい抗原を発現する細胞を選択する。例えば、ＣＤ４＋　Ｔ細胞は、より高いレベルのＣＤ２８を発現し、薄い濃度でＣＤ８＋　Ｔ細胞より効率的に捕捉される。一実施形態において、使用される細胞の濃度は、５×１０^{6}／ｍｌである。他の実施形態において、使用される濃度は、約１×１０^{5}／ｍｌ～１×１０^{9}／ｍｌ、およびその間の任意の整数値であり得る（例えば、１×１０^{5}／ｍｌ～１×１０^{8}／ｍｌ、１×１０^{6}／ｍｌ～１×１０^{7}／ｍｌ、１×１０^{7}／ｍｌ～１×１０^{9}／ｍｌ）。

【０３１３】

一実施形態において、本発明は、サンプル調製のための当該分野で公知の手順を包含し得る。例えば、Ｔ細胞は、洗浄工程後に凍結され得、使用前に融解され得る。凍結およびその後の融解は、細胞集団中の顆粒球をおよびある程度まで単球を除去することによって、より均質な生成物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程の後に、細胞は、凍結溶液の中に懸濁され得る。多くの凍結溶液およびパラメーターが当該分野で公知であり、この状況で有用である一方で、１つの方法は、２０％　ＤＭＳＯおよび８％　ヒト血清アルブミンを含むＰＢＳ、または例えば、ＨＥＳＰＡＮおよびＰＬＡＳＭＡＬＹＴＥＡを含む他の適切な細胞凍結培地を使用することを要し、次いで、その細胞は、１℃／分の速度で－８０℃へと凍結され、そして液体窒素貯蔵タンクの気相の中で貯蔵される。凍結制御の他の方法が、直ぐに－２０℃でまたは液体窒素中での制御されない凍結と同様に使用され得る。

【０３１４】

本発明の状況では、本明細書で記載されるとおりの拡大された細胞が必要とされ得るときより前の期間に、血液サンプルまたは白血球アフェレーシス生成物を被験体から集めることもまた、企図される。よって、拡大されるべき細胞の供給源は、必要な任意の時点で集められ得、そして所望の細胞（例えば、Ｔ細胞）は、Ｔ細胞療法から利益を受ける任意の数の疾患または状態（例えば、本明細書で記載されるもの）のために、Ｔ細胞療法において後に使用するために単離および凍結され得る。一実施形態において、血液サンプルまたは白血球アフェレーシスは、概して健康な被験体から採取される。ある種の実施形態において、血液サンプルまたは白血球アフェレーシスは、疾患を発症するリスクにあるが、疾患を未だ発症していない概して健康な被験体から採取され、そしてその目的の細胞は、後の使用のために単離および凍結される。ある種の実施形態において、Ｔ細胞は、後に拡大、凍結、および使用され得る。ある種の実施形態において、サンプルは、本明細書で記載されるとおりの特定の疾患の診断の直後であるが、何らかの処置の前に、患者から集められる。さらなる実施形態において、細胞は、任意の数の関連する処置モダリティー（抗ウイルス剤、化学療法、放射線療法、免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、およびＦＫ５０６）、抗体、または他の免疫除去薬剤（ｉｍｍｕｎｏａｂｌａｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔ）（例えば、ＣＡＭＰＡＴＨ、抗ＣＤ３抗体、サイトキシン（ｃｙｔｏｘｉｎ）、フルダラビン（ｆｌｕｄａｒｉｂｉｎｅ）、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ＦＲ９０１２２８、および照射）のような薬剤での処置が挙げられるが、これらに限定されない）の前に、被験体からの血液サンプルまたは白血球アフェレーシスから単離される。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害する（シクロスポリンおよびＦＫ５０６）か、または増殖因子誘導性シグナル伝達によって重要であるｐ７０Ｓ６キナーゼを阻害する（ラパマイシン）かのいずれかである（Ｌｉｕら，Ｃｅｌｌ　６６：８０７－８１５，１９９１；Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎら，Ｉｍｍｕｎ．７３：３１６－３２１，１９９１；Ｂｉｅｒｅｒら，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎ．５：７６３－７７３，１９９３；Ｉｓｏｎｉｅｍｉ（前出））。さらな

る実施形態において、細胞は、患者のために単離され、骨髄移植、フルダラビンのような化学療法剤、体外照射療法（ＸＲＴ）、シクロホスファミド、またはＯＫＴ３もしくはＣＡＭＰＡＴＨのような抗体のいずれかを使用するＴ細胞除去療法（Ｔ　ｃｅｌｌ　ａｂｌａｔｉｖｅ　ｔｈｅｒａｐｙ）とともに（例えば、その前に、同時にまたは後に）、後の使用のために凍結される。別の実施形態において、細胞は、事前に単離され、Ｂ細胞除去療法（例えば、ＣＤ２０と反応する薬剤、例えば、Ｒｉｔｕｘａｎ）後の処置に関して後の使用のために凍結され得る。

【０３１５】

本発明のさらなる実施形態において、Ｔ細胞は、処置の直後に患者から得られる。この点において、ある種の癌の処置、特に、免疫系を損傷する薬物での処置の後、処置の直ぐ後に、患者がその処置から正常に回復しつつある期間の間に、得られるＴ細胞の品質は、それらがエキソビボで拡大する能力に関して最適であるかまたは改善され得ることが観察された。同様に、本明細書で記載される方法を使用するエキソビボでの操作後に、これらの細胞は、増強された生着およびインビボでの拡大の好ましい状態にあり得る。従って、本発明の状況では、この回復相の間に血球（Ｔ細胞、樹状細胞、または造血系統の他の細胞を含む）を集めることが企図される。さらに、ある種の実施形態において、動員（ｍｏｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）（例えば、ＧＭ－ＣＳＦでの動員）および前処置レジメンは、被験体においてある状態を作り出すために使用され得る。ここで特に治療後の規定された時間帯の間に、特定の細胞タイプの再増殖（ｒｅｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ）、再循環、再生、および／または拡大が好都合である、例証的な細胞タイプとしては、Ｔ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞が挙げられる。

【０３１６】

任意の比のＴ細胞活性化分子：Ｔ細胞共刺激分子を含む足場は、本発明の方法に従って使用され得る。Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子がともに抗体である一実施形態において、各抗体の１：１比が使用され得る。一実施形態において、足場に結合されるＣＤ３：ＣＤ２８抗体の比は、１００：１～１：１００の範囲およびその間の全ての整数値である。本発明の一局面において、抗ＣＤ３抗体より多くの抗ＣＤ２８抗体が、足場に結合される。すなわち、ＣＤ３：ＣＤ２８の比は、１未満である。本発明のある種の実施形態において、足場に結合される抗ＣＤ２８抗体　対　抗ＣＤ３抗体の比は、２：１より大きい。１つの特定の実施形態において、足場に結合される抗体の１：１００　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。別の実施形態において、足場に結合される抗体の１：７５　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。さらなる実施形態において、足場に結合される抗体の１：５０　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。別の実施形態において、足場に結合される抗体の１：３０　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。１つの好ましい実施形態において、足場に結合される抗体の１：１０　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。別の実施形態において、足場に結合される抗体の１：３　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。さらに別の実施形態において、足場に結合される抗体の３：１　ＣＤ３：ＣＤ２８比が使用される。

【０３１７】

本発明の一局面は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記方法が上記足場との約１週間の接触後に、Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与するという驚くべき知見から生じる。一実施形態において、本発明の方法によれば、Ｔ細胞の集団の拡大において約１０倍～１０００倍、好ましくは約５０倍～５００倍、またはこれより大きい増大が、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に観察された。

【０３１８】

本発明の別の局面は、上記方法が、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触

後に、Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与するという驚くべき知見から生じる。一実施形態において、本発明の方法によれば、Ｔ細胞の集団の拡大において約２倍～１００倍、好ましくは約５倍～２０倍、またはこれより大きい増大は、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に観察された。

【０３１９】

本発明のさらに別の局面は、前述の方法に従ってＴ細胞を操作することが、Ｔ細胞の代謝活性を改善するという驚くべき知見から生じる。特に、Ｔ細胞の改善された代謝活性は、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との１週間の接触後に観察された。一実施形態において、本発明の方法によれば、Ｔ細胞の集団の代謝活性において約２倍～１００倍、好ましくは約５倍～２０倍、またはこれより高い改善が、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、上記足場との約１週間の接触後に観察された。

【０３２０】

本発明の別の局面は、上記方法が、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に、Ｔ細胞の集団のより良好な代謝活性を付与するという驚くべき知見から生じる。一実施形態において、本発明の方法によれば、約１倍（例えば、１００％増大）～２０倍、好ましくは２倍～１０倍の増大、またはこれより大きな増大は、Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、上記足場との約１週間の接触後に、Ｔ細胞の集団の拡大において観察された。

【０３２１】

さらに、本発明の方法によれば、拡大されたＴ細胞が、足場と接触後少なくとも約７日間にわたって代謝的に活性であることが見出された。Ｔ細胞代謝活性を、慣用的技術を介して、例えば、サイトカイン生成のレベルを分析するか、または細胞倍加をモニターして、測定した。さらに、本発明の方法によれば、拡大されたＴ細胞は、コントロール足場より大きなかつより安定した凝集物（例えば、より長く持続する）を形成した。例えば、１つの実験において、その拡大されたＴ細胞は、足場との接触後少なくとも約７日間にわたって安定な凝集物を形成したのに対して、その凝集物は、ＭＳＲ基部層およびＳＬＢ層のみを含むコントロール足場とともにインキュベートしたサンプル中ではかなり崩壊した。

【０３２２】

本発明のさらなる実施形態は、ＣＤ８＋　細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関し、上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ８＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；および検出されたＣＤ８＋　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。

【０３２３】

関連する実施形態において、本発明は、ＣＤ４＋　細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関し、上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ４＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；および検出されたＣＤ４＋　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。

【０３２４】

関連する実施形態において、本発明は、ＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３＋　細胞またはＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３－　細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本

発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ４＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；上記Ｔ細胞とＦＯＸＰ３＋　細胞の検出のための試薬とをさらに接触させる工程；および検出されたＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３＋　細胞またはＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３－　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、ＣＤ４＋および／またはＦＯＸＰ３＋　Ｔ細胞の検出および／または単離のための試薬は、好ましくは、ＣＤ４＋およびＦＯＸＰ３マーカーに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。この状況では、ＦＯＸＰ３が、調節性Ｔ細胞（これは、免疫応答を低下させる）の発生および機能における調節経路の主要調節因子として認識される限りにおいて、ある種の適用のためにＦＯＸＰ３＋　細胞を、および他の適用のためにＦＯＸＰ３－　細胞を単離することは、望ましいことであり得る。例えば、がん治療適用において、Ｔ細胞薬学的組成物において調節性Ｔ細胞　活性を排除または低減することは、望ましいことであり得る。よって、上記方法は、ＦＯＸＰ３－　細胞をスクリーニングするために適合され得る。あるいは、自己免疫疾患の処置の状況では、Ｔ細胞薬学的組成物において調節性Ｔ細胞活性を増大させることは、望ましいことであり得る（なぜなら弱められた調節性Ｔ細胞活性は、身体の自己免疫状態に寄与していることもあるからである）。よって、このような場合には、製剤化方法は、ＦＯＸＰ３＋　細胞を正に選択し、かつ含むように改変され得る。

【０３２５】

さらに別の実施形態において、本発明は、エフェクターメモリーおよび／またはエフェクターＴ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ４４＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；上記Ｔ細胞とＣＤ６２Ｌの検出のための試薬とをさらに接触させる工程；および検出されたＣＤ４＋／／ＣＤ６２Ｌ＋　Ｔ細胞またはＣＤ４＋／／ＣＤ６２Ｌ－　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、そのエフェクターメモリーおよび／またはエフェクターＴ細胞は、好ましくは　ＣＤ４＋／／ＣＤ６２Ｌ－である。

【０３２６】

さらに別の実施形態において、本発明は、活性化ＣＤ８＋　Ｔ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ８＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；上記Ｔ細胞とＣＤ６９＋の検出のための試薬とをさらに接触させる工程；検出されたＣＤ８＋／／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞またはＣＤ８＋／／ＣＤ６９－　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、その活性化Ｔ細胞は、好ましくは、ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋である。

【０３２７】

さらに別の実施形態において、本発明は、サイトトキシン分泌Ｔ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ８＋　細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；上記Ｔ細胞とグランザイムＢの検出のための試薬とをさらに接触させる工程；および検出されたＣＤ８＋／／グランザイムＢ＋　Ｔ細胞またはＣＤ８＋／／グランザイムＢ－　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、そのサイトトキシン分泌Ｔ細胞は、好ましくは、ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋である。

【０３２８】
さらに別の実施形態において、本発明は、アクチベーターサイトカイン分泌Ｔ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＩＦＮγ＋の検出のための試薬とを接触させる工程；および検出されたＩＦＮγ＋　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、そのＴ細胞は、好ましくは、ＩＦＮγ分泌細胞である。
【０３２９】
さらに別の実施形態において、本発明は、メモリーＴ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；および検出されたＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、そのＴ細胞は、好ましくは、ＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　ＣＤ４＋　セントラルメモリーＴ細胞である。Ｏｋａｄａら，　Ｉｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　２０（９）：１１８９－９９，　２００８を参照のこと。別の実施形態において、本発明は、メモリーＴ細胞のポリクローナル集団を得るための方法に関し、上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；および検出されたＣＤ６２Ｌ－ＣＣＲ７－　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。これらの実施形態において、そのＣＤ６２Ｌ－ＣＣＲ７－　Ｔ細胞は、エフェクターメモリーＴ細胞である。Ｓａｌｌｕｓｔｏら，　Ｎａｔｕｒｅ　４０１：　７０８－７１２，　１９９９を参照のこと。
【０３３０】
さらに別の実施形態において、本発明は、消耗したＴ細胞のポリクローナル集団を検出し、そして／またはサンプルから除去するための方法に関する。上記方法は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル中に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＣＤ８＋　Ｔ細胞の検出のための試薬とを接触させる工程；上記Ｔ細胞とＰＤ－１＋　Ｔ細胞の検出のための試薬とをさらに接触させる工程；および検出されたＣＤ８＋／　ＰＤ－１＋　Ｔ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する。そのＣＤ８＋／　ＰＤ－１＋　Ｔ細胞（これは、消耗した細胞を示す）は、上記サンプルから必要に応じて排除され得る。
【０３３１】
Ｔ細胞を検出し、そして／またはサンプルから除去するための別の実施形態において、本発明は、本発明の足場と被験体の生物学的サンプルとを接触させ、それによって、上記サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大する工程；上記サンプル中のＴ細胞とＴ細胞上の共阻害レセプターの検出のための試薬とを接触させる工程；および上記共阻害レセプターを発現するＴ細胞の部分集団を上記サンプルから単離する工程を包含する方法を提供する。共阻害レセプターの発現は一般に、消耗した細胞を示し、これは、サンプルから必要に応じて排除され得る。これらの実施形態において、その共阻害レセプターは、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、２Ｂ４、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０およびＫＬＲＧ１からなる群より選択されるレセプターである。Ｌｅｇａｔｏら，　Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　２０１３　Ｄｅｃ　１９；４：４５５を参照のこと。
【０３３２】
前述の実施形態において、細胞の検出および／または単離のための試薬は、好ましくは

、抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、前述のマーカー、例えば、ＣＤ８、ＣＤ４、ＦＯＸＰ３、ＣＤ６２Ｌ、ＰＤ－１、グランザイムＢなどに特異的に結合する抗体である。これらの細胞表面マーカーの検出は、好ましくは、ＦＡＣＳ分析を使用して行われる。

【０３３３】

本発明はさらに、ポリクローナルＴ細胞集団を、前述の方法のうちの１種またはこれより多くを使用して単離すること、およびさらに、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、組織壊死因子α（ＴＮＦα）、ＩＬ－２、ＩＬ－１、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出することに関する。そのサイトカインは、単離方法の実証を可能にし得る。例えば、操作されたＴ細胞がＴヘルパー１（Ｔｈ１）細胞である場合、その方法は、ＩＬ－２、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）および組織壊死因子α（ＴＮＦα）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含し得る。同様に、その操作されたＴ細胞がＴヘルパー２（Ｔｈ２）細胞である場合、上記方法は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０およびＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する。さらに、その操作されたＴ細胞が細胞傷害性Ｔ（Ｔｃ）細胞である場合、上記方法は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）およびリンホトキシンα（ＬＴα／ＴＮＦβ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を、必要に応じてグランザイムもしくはパーフォリン、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される分泌型サイトトキシンの検出と一緒に検出する工程をさらに包含し得る。

【０３３４】

ある種の方法論を使用すると、最初の活性化および刺激後に、Ｔ細胞を、約１２～約１４日間の期間の後に刺激から分離することによって、そのＴ細胞の集団の長期間刺激を維持することは、有利であり得る。Ｔ細胞増殖の速度は、例えば、サイズを調べるかまたはＴ細胞の容積を（例えば、コールターカウンタ-で）測定することによって、周期的に（例えば、毎日）モニターされる。この点において、静止Ｔ細胞は、約６．８ミクロンの平均直径を有し、最初の活性化および刺激に際して、刺激リガンドの存在下では、そのＴ細胞の平均直径は、４日目までに１２ミクロン超へと増大し、約６日目までに低下し始める。平均Ｔ細胞直径が、およそ８ミクロンへと低下する場合、そのＴ細胞は、Ｔ細胞のさらなる増殖を誘導するために再活性化および再刺激され得る。あるいは、Ｔ細胞増殖の速度およびＴ細胞再刺激のための時間は、細胞表面分子（例えば、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ６２Ｌ、ＦＯＸＰ３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ２８、およびＣＤ１３４、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される細胞表面マーカー）の存在に関してアッセイすることによってモニターされ得る。さらに、上記方法は、非Ｔ細胞表面分子（例えば、ＣＤ３６、ＣＤ４０、およびＣＤ４４、またはこれらの組み合わせ）の存在に関してアッセイすることによって補完され得る。ある種の場合では、上記方法は、非Ｔ細胞表面分子（例えば、ＣＤ１５４、ＣＤ５４、ＣＤ２５、ＣＤ１３７、ＣＤ１３４（これらは、活性化Ｔ細胞上で誘導される））の存在に関してアッセイすることによって補完され得る。

【０３３５】

疾患の診断および治療

本明細書で記載される実施形態はさらに、被験体において疾患または障害を処置するための方法に関する。一実施形態において、その疾患は、がんである。別の実施形態において、その疾患は、自己免疫障害である。第３の実施形態において、その疾患は、病原体によって引き起こされる疾患である。

【０３３６】

これらの実施形態において、疾患を有する被験体はＴ細胞集団を含むその被験体のサンプルと、本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させ、それによって、Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；必要に応

じてＴ細胞の集団を拡大する工程；およびその活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体における疾患を処置する工程によって処置され得る。一実施形態において、そのＴ細胞集団は、例えば、０．５日間、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、３８日間、４５日間、５０日間、６０日間、またはこれより長い期間にわたって足場と接触され、そしてその中に含まれる細胞は、前述の技術のうちの１種またはこれより多くを使用して操作される。操作の例としては、例えば、活性化、分裂、分化、成長、拡大、再プログラミング、アネルギー、静止、老化、アポトーシス、死滅などが挙げられる。その細胞は、操作されるべき足場から物理的に除去される必要はない。従って、一実施形態において、その足場は、被験体のサンプルとインサイチュで（例えば、足場を被験体に移植することによって）接触される。他の実施形態において、その細胞は、エキソサイチュで操作される（例えば、その足場およびその被験体の引き抜かれた血液サンプルをインキュベートする）。

【０３３７】

本発明の治療的実施形態において、哺乳動物に投与されるＴ細胞は、約４～約３５日齢であり、すると、哺乳動物における疾患の退縮が促進される。いくつかの実施形態において、その投与されるＴ細胞は、約１４日齢未満、例えば、約７～約２１日齢である。本発明の方法は、多くの利点を提供する。例えば、約４～約１４日齢であるＴ細胞は、約６０日齢または約６０日齢超であるＴ細胞と比較して、改善されたインビボでの増殖、生存および活性を提供すると考えられる。養子細胞療法（ＡＣＴ）のＴ細胞を生成するために必要とされる期間は、平均約４４日間から、約４～約１５日間の範囲（または約３５日間未満、例えば、約７～約１５日間）へと短縮され得る。よって、より多くの患者が、彼らの疾患負荷が、ＡＣＴの投与がもはや安全または可能ではない可能性があるステージへと進行する前に、処置され得る。さらに、本発明の方法の好ましい実施形態は、投与前に特異的抗原反応性のインビトロ試験を要求しないことから、本発明の方法は、患者の処置と関連する時間、費用、および労働を低減する。さらに、本発明の方法は、有利なことには、ミクロ培養から得られたものの代わりに、バルク培養からプールされたＴ細胞を投与し得る。臨床上有効なＴ細胞を生成するためのより単純かつより迅速な方法の開発は、養子細胞療法の使用のより大きな拡がりを助けると考えられる。本発明の方法はまた、有利なことには、特異的抗原反応性のインビトロでの試験によって、インビボで非反応性であると誤って推定され得るＴ細胞培養物を利用する。単一の腫瘍標本から生成されるＴ細胞培養物は、多様な特異的反応性を有するので、インビトロでの抗原反応性試験がないことで、有利なことには、ごくわずかなＴ細胞培養物を選択して拡大しなければならないことが回避され、従って、患者に投与されるべき腫瘍反応性のより多様なレパートリーを提供する。約４～約３０日齢であるＴ細胞はまた、細胞のより大きな多様性を含み、ならびにＴ細胞より活性／健康な細胞の出現率がより高い。さらに、本発明の方法の１種またはこれより多くの局面（例えば、培養および／または拡大が挙げられるが、これらに限定されない）は、自動化可能であり得る。

【０３３８】

上記方法の一実施形態は、自家Ｔ細胞を培養する工程を包含する。腫瘍サンプルは、患者から得られ、単一の細胞懸濁物が得られる。その単一の細胞懸濁物は、任意の適切な様式で、例えば、機械的に（例えば、ＧＥＮＴＬＥＭＡＣＳ^{TM} Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，Ｃａｌｉｆ．）を使用して腫瘍をバラバラにする）または酵素的に（例えば、コラゲナーゼまたはＤＮａｓｅ）、得られ得る。腫瘍酵素消化物の単一細胞懸濁物は、本発明の足場において培養され得る。その細胞は、コンフルエントになるまで（例えば、約２×１０^{6}リンパ球）、例えば、約２～約２１日間、好ましくは約４～約１４日間培養される。例えば、細胞は、５日間、５．５日間、または５．８日間、６．０日間、６．５日間、７．０日間～２１日間、２１．５日間

、または２１．８日間、好ましくは１０日間、１０．５日間、または１０．８日間～１４日間、１４．５日間、または１４．８日間、培養され得る。

【０３３９】

上記方法の一実施形態は、培養されたＴ細胞を拡大する工程を包含する。その培養されたＴ細胞は、プールされ、迅速に拡大される。迅速な拡大は、約７～約１４日間、好ましくは約１４日間の期間にわたって、少なくとも約１０倍（例えば、１０倍、２０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、もしくは１００倍、または１００倍超）の抗原特異的Ｔ細胞の数の増大を提供する。より好ましくは、迅速な拡大は、約７～約１４日間、好ましくは約１４日間の期間にわたって、少なくとも約２００倍（例えば、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、または９００倍超）の増大を提供する。最も好ましくは、迅速な拡大は、約１０～約１４日間、好ましくは約１４日間の期間にわたって、少なくとも約４００倍または４００倍超の増大を提供する。必要に応じて、その細胞は、足場における最初の拡大を受け得る。その際に、それらは、迅速な拡大を受けやすい。この２工程の拡大プロトコルの下で、約７～１４日間の期間にわたる約１０００倍の増大が、達成され得る。

【０３４０】

拡大は、当該分野で公知であるとおりの多くの方法のうちのいずれかによって達成され得る。例えば、Ｔ細胞は、フィーダーリンパ球およびインターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）のいずれか（ＩＬ－２が好ましい）の存在下で、非特異的Ｔ細胞レセプター刺激を使用して迅速に拡大され得る。その非特異的Ｔ細胞レセプター刺激は、およそ３０ｎｇ／ｍｌのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ（登録商標），　Ｒａｒｉｔａｎ，　Ｎ．Ｊ．から入手可能）を含み得る。あるいは、Ｔ細胞は、がんの１種またはこれより多くの抗原（細胞の抗原性部分（例えば、エピトープ）または細胞が挙げられる）で、Ｔ細胞増殖因子（例えば、３００　ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２またはＩＬ－１５（ＩＬ－２が好ましい）の存在下で、インビトロで末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を刺激することによって迅速に拡大され得る。これら抗原は、必要に応じてベクターから発現され得る（ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μｍ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐ１００：２０９－２１７（２１０Ｍ））。そのインビトロで誘導したＴ細胞は、ＨＬＡ－Ａ２発現抗原提示細胞に適用されるがんのその同じ抗原での再刺激によって迅速に拡大される。あるいは、そのＴ細胞は、照射した自家リンパ球または照射したＨＬＡ－Ａ２＋　同種異系リンパ球および例えばＩＬ－２で、再刺激され得る。

【０３４１】

上記方法の一実施形態は、被験体に拡大したＴ細胞を投与する工程を包含し、ここでその哺乳動物に投与されるＴ細胞は、約４～約３５日齢である。例えば、その投与される細胞は、６、７、もしくは８～１４、１５、もしくは１６日齢であり得る。いくつかの実施形態において、その哺乳動物に投与されるＴ細胞は、約４～約２９日齢または約７～約１５日齢、または約１０日齢である。この点において、本発明の一実施形態に従ってその哺乳動物に投与されるＴ細胞は、「若い」Ｔ細胞、すなわち、最小限に培養されたＴ細胞である。

【０３４２】

本発明の一実施形態に従ってその哺乳動物に投与される若いＴ細胞培養物は、有利なことには、インビボでの持続性、増殖、および抗腫瘍活性と関連する特徴を有する。例えば、若いＴ細胞培養物は、約４４日齢であるＴ細胞より高いＣＤ２７および／またはＣＤ２８の発現を有する。特定の理論に拘束されず、ＣＤ２７およびＣＤ２８は、増殖、インビボでの持続性、およびＴ細胞のより少ない分化状態と関連すると考えられる（Ｔ細胞の増大した分化は、Ｔ細胞がインビボで機能する能力に負の影響を及ぼすと考えられる）。より高いレベルのＣＤ２７を発現するＴ細胞は、ＣＤ２７が低い細胞より良好な抗腫瘍活性を有すると考えられる。さらに、若いＴ細胞培養物は、約４４日齢であるＴ細胞より高い出現率のＣＤ４＋　細胞を有する。

【０３４３】
さらに、若いＴ細胞培養物は、約４４日齢であるＴ細胞のものより長い平均テロメア長を有する。特定の理論に拘束されず、Ｔ細胞は、培養において１週間あたり０．８ｋｂの推測テロメア長を失い、そして若いＴ細胞培養物は、約４４日齢であるＴ細胞より約１．４ｋｂ長いテロメア得を有すると考えられる。特定の理論に拘束されず、より長いテロメア長は、患者における正の客観的臨床応答、およびインビボでの細胞の持続性と関連すると考えられる。
【０３４４】
Ｔ細胞は、当該分野で公知であるとおりの任意の適切な経路によって投与され得る。好ましくは、Ｔ細胞は、動脈内または静脈内注入物として投与され、これは、好ましくは約３０～約６０分間続く。投与経路の他の例としては、皮下、腹腔内、くも膜下およびリンパ内が挙げられる。
【０３４５】
さらに、本発明の実施形態は、拡大された細胞を含む治療用組成物を投与する種々の様式を提供する。一実施形態において、その拡大された細胞は、先ず精製され、次いで、被験体に投与される。あるいは、その拡大された細胞は、被験体へと投与する前に、本発明の足場と混合され得る。この代替のアプローチの下では、その足場（ＡＰＣ－ＭＳ）は、インビボで細胞を刺激し続け得、また、インビボの状況において標的全血球を選択的に操作するように機能し得る。
【０３４６】
本発明の治療方法は、投与工程の前に、Ｔ細胞の集団を再刺激する工程を包含し得る。その再刺激工程は、当該分野で公知の技術を使用して行われ得る。一実施形態において、その再刺激工程は、細胞を足場組成物とともに再インキュベートすることによって行われる。別の実施形態において、再刺激は、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ、１０ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，　Ｉｎｃ．）、イオノマイシン（０．５μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，　Ｉｎｃ．）およびブレフェルジンＡ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｉｎｃ．）の添加によって行われる。さらに別の実施形態において、その再刺激工程は、抗原（例えば、病原体抗原またはがん抗原）を足場の中にまたは培養物の中に外因的に含めることによって行われる。
【０３４７】
一実施形態において、その治療方法は、被験体の血液サンプル、骨髄サンプル、リンパ液サンプルまたは脾臓サンプルから得られるＴ細胞を操作することによって行われる。
【０３４８】
よって、本発明の実施形態は、被験体においてがんを処置するための方法を提供する。上記方法は、Ｔ細胞集団を含むその被験体のサンプルと本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させ、それによってＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；その活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞をその被験体に投与し、それによって、その被験体においてがんを処置する工程を包含する。ある種の実施形態において、その足場は、がん抗原とともに提供される。一実施形態において、そのがん抗原は、ＭＨＣ分子またはそのフラグメントにおいて、例えば、Ｔ細胞による認識のために提示される。ある種の場合では、全細胞生成物が、提供され得る。
【０３４９】
がん抗原の代表的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＣＥＡ、チロシナーゼ、ミッドカイン、ＢＡＧＥ、ＣＡＳＰ－８、β－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ＣＡ－１２５、ＣＤＫ－１、ＣＤＫ４、ＥＳＯ－１、ｇｐ７５、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１、ＭＵＣ－１、ＭＵＭ－１、ｐ５３、ＰＡＰ、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ｒａｓ、ｔｒｐ－１、ＨＥＲ－２、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＩＬ１３Ｒα、ＩＬ１３Ｒα２、ＡＩＭ－２、ＡＩＭ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｃ９ｏｒｆ　１１２、ＳＡＲＴ１、ＳＡＲＴ２、ＳＡＲＴ３、ＢＲＡＰ、ＲＴＮ

４、ＧＬＥＡ２、ＴＮＫＳ２、ＫＩＡＡ０３７６、ＩＮＧ４、ＨＳＰＨ１、Ｃ１３ｏｒｆ２４、ＲＢＰＳＵＨ、Ｃ６ｏｒｆ１５３、ＮＫＴＲ、ＮＳＥＰ１、Ｕ２ＡＦ１Ｌ、ＣＹＮＬ２、ＴＰＲ、ＳＯＸ２、ＧＯＬＧＡ、ＢＭＩ１、ＣＯＸ－２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＺＨ２、ＬＩＣＡＭ、Ｌｉｖｉｎ、Ｌｉｖｉｎβ、ＭＲＰ－３、ネスチン、ＯＬＩＧ２、ＡＲＴ１、ＡＲＴ４、Ｂ－サイクリン、Ｇｌｉ１、Ｃａｖ－１、カテプシンＢ、ＣＤ７４、Ｅ－カドヘリン、ＥｐｈＡ２／Ｅｃｋ、Ｆｒａ－１／Ｆｏｓｌ　１、ＧＡＧＥ－１、ガングリオシド／ＧＤ２、ＧｎＴ－Ｖ、β１，６－Ｎ、Ｋｉ６７、Ｋｕ７０／８０、ＰＲＯＸ１、ＰＳＣＡ、ＳＯＸ１０、ＳＯＸ１１、サバイビン、ＵＰＡＲ、ＷＴ－１、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＩＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤ　Ａｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸関連抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、Ｔ細胞レセプター／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－Ｉ、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＲＣＡＳｌ、α－フェトプロテイン、ｐｌ２０ｃｔｎ、Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、脳型グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－Ｉ、ＣＴ－７、ｃｄｃ２７、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、ＰｌＡ、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐｌ５、ＧＭ２、ＧＤ２　ガングリオシド、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、ｌｍｐ－１、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－Ｉ、ＵＬ１６結合タンパク質様転写物１（Ｍｕｌｔ１）、ＲＡＥ－１タンパク質、Ｈ６０、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、およびｃ－ｅｒｂＢ－２、またはこれらの免疫原性ペプチド、ならびにこれらの組み合わせ。

【０３５０】

別の実施形態において、そのがん抗原は、患者において同定されるネオアンチゲンである。ネオアンチゲン決定基は、ネオアンチゲン上のエピトープであり、これは、免疫系が以前に認識していなかった新たに形成された抗原である。ネオアンチゲンはしばしば、腫瘍抗原と関連し、腫瘍形成細胞において見出される。ネオアンチゲンおよびさらに拡げると、ネオアンチゲン決定基は、タンパク質が生化学的経路内でのさらなる改変（例えば、グリコシル化、リン酸化またはタンパク質分解）を受け、新しいエピトープの生成をもたらす場合に形成され得る。これらのエピトープは、別個の特異的抗体によって認識され得る。Ｓｃｈｕｍａｃｈｅｒら，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３４８（６２３０）：　６９－７４，２０１５を参照のこと。一実施形態において、ネオアンチゲンは、患者特異的様式で検出され得る。患者サンプル、例えば、血液サンプルからネオアンチゲンを検出するための方法は、米国特許第９，１１５，４０２号（これは、本明細書に参考として援用される）に記載される。一実施形態において、ネオアンチゲンは、ＳＦ３Ｂ１、ＭＹＤ８８、ＴＰ５３、ＡＴＭ、Ａｂｌ、Ａ　ＦＢＸＷ７、ＤＤＸ３Ｘ、ＭＡＰＫ１、ＧＮＢ１、ＣＤＫ４、ＭＵＭ１、ＣＴＮＮＢ１、ＣＤＣ２７、ＴＲＡＰＰＣ１、ＴＰＩ、ＡＳＣＣ３、ＨＨＡＴ、ＦＮ１、ＯＳ－９、ＰＴＰＲＫ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＨＬＡ－Ａ１１、ＧＡＳ７、ＧＡＰＤＨ、ＳＩＲＴ２、ＧＰＮＭＢ、ＳＮＲＰ１１６、ＲＢＡＦ６００、ＳＮＲＰＤ１、Ｐｒｄｘ５、ＣＬＰＰ、ＰＰＰ１Ｒ３Ｂ、ＥＦ２、ＡＣＴＮ４、ＭＥ１、ＮＦ－ＹＣ、ＨＬＡ－Ａ２、ＨＳＰ７０－２、ＫＩＡＡ１４４０、ＣＡＳＰ８に由来するペプチド、またはこれらの組み合わせである。Ｌｕら，　Ｓｅｍｉｎａｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（１），　２２－２７，　２０１６を参照のこと。

【０３５１】

上記で概説されるがん治療実施形態を実施するにあたって、細胞傷害性Ｔ細胞特異的活性化分子および細胞傷害性Ｔ細胞特異的共刺激分子とともに、必要に応じて細胞傷害性Ｔ細胞の活性化、分裂、分化、成長、拡大、または再プログラミングを付与する１種またはこれより多くのさらなる薬剤と一緒に製作された足場を提供することは、有利であり得る。このような分子の代表的な例は、上記で提供されている。

【０３５２】

ある種の実施形態において、その隔離されたおよび／または単離された細胞は、遺伝的に改変され得る。一実施形態において、エフェクター細胞は、ＣＤ１９に対して特異的な

キメラ抗原レセプター（ＣＡＲ）を発現するように遺伝的に改変される（ＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞）。この特定のタイプのＴ細胞は、小規模の第Ｉ相臨床試験において再発性および難治性のＢ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）を有する成人および小児患者において高率の完全奏効（ＣＲ）を生じた。Ｔｕｒｔｌｅら（Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．，　１２６，　２１２３－３８，　２０１６）およびその中で引用される参考文献を参照のこと。好都合な結果は、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）および慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）においてＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞療法の臨床試験においても認められた。これらの研究は、レシピエントにおいて移入したＣＡＲ－Ｔ細胞の強い増殖が臨床応答と相関し、機能的ＣＡＲ－Ｔ細胞の長期間のインビボ持続性が、疾患再発を防止し得ることを示唆する。よって、一実施形態において、本発明は、がん治療のためのＴ細胞組成物をさらに製剤化するための方法に関し、上記方法は、足場から得られるＴ細胞をさらに遺伝的に改変する工程を包含する。その遺伝的改変は、エキソサイチュまたはインサイチュで媒介され得る。任意の技術が、Ｔ細胞を遺伝的に改変するために使用され得る（ウイルスベクター、プラスミド、トランスポゾン／トランスポザーゼ系、ｓｈＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡなどを使用することが挙げられるが、これらに限定されない）。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、遺伝子編集系（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系）を使用して遺伝的に改変されている。いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、ウイルス送達系を使用して遺伝的に改変される。いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、レンチウイルス系を使用して遺伝的に改変される。いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、レトロウイルス系を使用して遺伝的に改変される。いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、アデノウイルス系を使用して遺伝的に改変される。いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、ウイルス送達系またはウイルス隔離との相互作用を促進する薬剤（例えば、ウイルス送達系とのレセプター媒介性相互作用を促進する薬剤またはウイルス送達系との静電的相互作用を促進する薬剤）と接触される。

【０３５３】

いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、ウイルス送達系をインサイチュで使用して遺伝的に改変される。その単離されたＴ細胞がインサイチュで遺伝的に改変される実施形態において、足場は、ウイルス隔離を促進する薬剤を含み得る。ウイルス隔離を促進する薬剤は、吸着を通じて、または脂質ヘッド基への付着によってかのいずれかで、ＭＳＲ－ＳＬＢの脂質二重層の表面上に存在し得る。いくつかの実施形態において、ウイルス隔離を促進する薬剤は、フィブロネクチンペプチド（例えば、ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ（登録商標））である。いくつかの実施形態において、ウイルス隔離を促進する薬剤は、両親媒性ペプチド（例えば、Ｖｅｃｔｏｆｕｓｉｎ－１（登録商標））である。いくつかの実施形態において、足場は、Ｔ細胞活性化分子、Ｔ細胞共刺激分子および／またはＴ細胞ホメオスタシス因子をさらに含み得る。いかなる特定の理論によっても拘束されることは望まないが、Ｔ細胞が、ウイルス隔離を促進する薬剤を、Ｔ細胞活性化分子、Ｔ細胞共刺激分子および／またはＴ細胞ホメオスタシス因子と組み合わせて含む足場と接触される場合、その足場は、細胞クラスター化をもたらし得、かつウイルス送達系がＴ細胞と直ぐ近接して存在し、それによって、その細胞のより効率的な形質導入を促進することを可能にし得るＴ細胞の活性化および拡大を促進し得ると考えられる。その足場上に存在するＴ細胞活性化分子、Ｔ細胞共刺激分子および／またはＴ細胞ホメオスタシス因子は、得られたＴ細胞の治療有効性を増強し得る所望のＴ細胞表現型を生じるように選択され得る（例えば、Ｓｏｍｍｅｒｍｅｙｅｒら，　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　３０（２）：　４９２－５００（２０１６）を参照のこと）。

【０３５４】

いくつかの実施形態において、その単離されたＴ細胞は、キメラ抗原レセプター（ＣＡＲ）を発現するように遺伝的に改変される。一実施形態において、ＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　Ｔ細胞は、ＣＤ１９　ＣＡＲ、および抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体セツキシマブを使用するフローサイトメトリーによって形質導入された細胞の同定を可能にする短縮型

ヒト上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲｔ）を発現するようにレンチウイルスで形質導入される。形質導入されたＥＧＦＲｔ＋　ＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　Ｔ細胞は、照射されたＣＤ１９＋　リンパ芽球細胞株（ＬＣＬ）での単一の刺激による培養の間に富化される。注入物に関するリリース時の製品中のＣＤ３＋ＣＤ４＋　およびＣＤ３＋ＣＤ８＋部分セット内のＥＧＦＲｔ＋　ＣＡＲ－Ｔ細胞のメジアン出現率（これは、良好な治療転帰を付与する）は、それぞれ、約８０％（範囲　５０．０％～９５．９％）および約８５％（範囲　１３．０％～９５．６％）である。Ｔｕｒｔｌｅら（Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．，　１２６，　２１２３－３８，　２０１６）を参照のこと。その遺伝的に改変されたＴ細胞は、Ｔ細胞生成物を本発明の足場とともにインキュベートすることによってさらに拡大され得る。一実施形態において、ＣＡＲ　Ｔ細胞特異的抗原、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２２またはこれらのフラグメントまたはこれらの改変体を含む足場は、所望のＣＡＲ　Ｔ細胞を選択的に拡大するために使用され得る。

【０３５５】

ある種の実施形態において、足場は、がん治療法を実施するにあたって有用である生成物とともに提供される。代表的な例としては、例えば、Ｂ細胞のハイブリドーマ、Ｔ細胞の安定な系統、Ｂ細胞もしくはそのハイブリドーマに由来する抗体、がん抗原に結合するレセプター（抗原を提示するＭＨＣ分子に結合するレセプター）（これらのフラグメントを含む）、これらのレセプターもしくは抗原結合ドメインをコードする核酸、抗体をコードする核酸が挙げられ、全細胞を含む。

【０３５６】

本発明の実施形態は、被験体において免疫不全障害を処置するための方法を提供し、上記方法は、Ｔ細胞集団を含む被験体のサンプルと本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させ、それによって、Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；そのＴ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；およびその活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、その被験体に投与し、それによって、その被験体において免疫不全障害を処置する工程を包含する。

【０３５７】

一実施形態において、原発性免疫不全障害および後天性免疫不全障害からなる群より選択される免疫不全障害を処置するための方法が提供され、上記方法は、Ｔ細胞集団を含む被験体のサンプルと本発明のＡＰＣ－ＭＳとを接触させ、それによって、Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；そのＴ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；およびその活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を被験体に投与し、それによって、その被験体において免疫不全障害を処置する工程を包含する。一実施形態において、その免疫不全障害は、後天性免疫不全障害、例えば、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）または遺伝性障害、例えば、ディジョージ症候群（ＤＧＳ）、染色体切断症候群（ＣＢＳ）、毛細血管拡張性運動失調症（ＡＴ）およびウィスコット－オルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、またはこれらの組み合わせであり得る。

【０３５８】

上記で概説されるように、免疫不全障害の治療を実施するにあたって、ヘルパーＴ細胞特異的活性化分子およびヘルパーＴ細胞特異的共刺激分子とともに、必要に応じてヘルパーＴ細胞の活性化、分裂、分化、成長、拡大、または再プログラミングを付与する１種またはこれより多くのさらなる薬剤と一緒に製作された足場を提供することは、有利であり得る。このような分子および薬剤の代表的な例としては、上記で提供されている。

【０３５９】

本発明の実施形態は、被験体において病原体による疾患を処置するための補右方を提供し、上記方法は、Ｔ細胞集団を含む被験体のサンプルと本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させ、それによって、Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；そのＴ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；お

よびその活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を被験体に投与し、それによって、その被験体において病原体による疾患を処置する工程を包含する。場合によっては、操作工程から得られる免疫細胞または組成物は、予防的に、例えば、被験体において疾患の症状が開始する前に投与され得る。前述の実施形態に従って処置され得る病原体による疾患としては、細菌疾患、ウイルス疾患、真菌疾患、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【０３６０】

本発明の実施形態は、被験体において自己免疫疾患を処置するための方法を提供する。上記方法は、Ｔ細胞集団を含む被験体のサンプルと本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させ、それによって、Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、そしてホメオスタシス的に維持する工程；そのＴ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；およびその活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を被験体に投与し、それによって、その被験体における自己免疫疾患を処置する工程を包含する。

【０３６１】

自己免疫疾患を処置する状況では、活性な免疫細胞を投与するのではなく（なぜならこれらは自己反応性であるので）、むしろ静止、老化または不活性化された免疫細胞を投与することは、好ましいことであり得る。好ましくは、その免疫細胞は、Ｔ細胞である。あるいは、免疫細胞（例えば、調節性Ｔ細胞またはサプレッサーＴ細胞）の調節因子が、投与され得る。その足場／デバイスは、Ｔｓ／Ｔｒｅｇ細胞部分集団（これは、次いで、被験体へと投与される）の操作のために製作され得る。

【０３６２】

よって、いくつかの実施形態において、本発明は、自己免疫疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、必要性のある被験体に、本発明の足場を投与する工程であって、ここでその足場の中の複数の抗原は、自己免疫疾患に対して特異的である工程、その足場／デバイスの中の複数の調節性またはサプレッサーＴ細胞を集める工程であって、ここでその複数の調節性またはサプレッサーＴ細胞は、その自己免疫抗原に対して特異的である工程、ならびにその複数の調節性Ｔ細胞またはサプレッサーＴ細胞またはこれらに由来する生成物をその被験体へと投与し、それによって自己免疫疾患を処置する工程による。

【０３６３】

自己免疫疾患の治療を実施するにあたって有用である細胞生成物としては、例えば、自己反応性細胞に結合する抗体およびレセプター、サプレッサーまたは調節性Ｔ細胞に位置する調節性タンパク質（このような分子をコードする核酸配列を含む）が挙げられる。

【０３６４】

上記の治療的実施形態において、細胞は、約５×１０^{2}　細胞／ｍｌ～約１×１０^{9}　細胞／ｍｌを含む全細胞濃度において製剤化され得る。Ｔ細胞の好ましい用量は、約２×１０^{6}　細胞～約９×１０^{7}　細胞の範囲に及ぶ。

【０３６５】

本発明の実施形態はさらに、前述の組成物のうちの１種またはこれより多くを投与することによる疾患の治療に関する。その組成物は、薬学的組成物であり得、これは、それらの意図された目的を達成する任意の手段によって投与される。例えば、投与は、非経口、皮下、静脈内、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、経皮、経粘膜、大脳内、くも膜下、または室内経路によるものであり得る。あるいは、または同時に、投与は、経口経路によるものであり得る。その薬学的組成物は、ボーラス注射によって、または経時的に徐々に灌流することによって、非経口的に投与され得る。

【０３６６】

投与される投与量は、レシピエントの年齢、性別、健康状態、および体重、同時処置の種類（あるとすれば）、処置の頻度、ならびに望ましい効果の性質に依存し得る。薬学的組成物の投与のための用量範囲は、所望の効果を生じるために十分大きくてもよく、それによって、例えば、自己反応性Ｔ細胞は枯渇され、そして／または自己免疫疾患は、顕著に防止、抑制、または処置される。その用量は、有害な副作用（例えば、望ましくない交

差反応、全身の免疫抑制、アナフィラキシー反応など）を引き起こすほど大きくてはならない。

【０３６７】

本明細書で記載される実施形態はさらに、被験体において疾患または障害を検出または診断するための方法に関する。任意の疾患または障害が、前述の方法を使用して検出または診断され得る。特に好ましくは、その疾患は、関節リウマチ、狼瘡、セリアック病、炎症性腸疾患もしくはクローン病、シェーグレン症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性硬化症、強直性脊椎炎、Ｉ型糖尿病、円形脱毛症、血管炎、側頭動脈炎などからなる群より選択される自己免疫疾患である。他の実施形態において、その疾患は、頭頚部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、食道がん、骨がん、精巣がん、子宮頚がん、消化器がん、膠芽腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺における前癌病変、結腸がん、黒色腫、および膀胱がんからなる群より選択されるがんである。前述の実施形態に従って診断され得る病原体による疾患としては、細菌疾患、ウイルス疾患、真菌疾患、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

【０３６８】

これらの実施形態において、疾患を有する被験体は、目的の免疫細胞を含む被験体のサンプルと本発明の足場とを先ず接触させることによって診断され得、ここでその足場の中の抗原は、その疾患に対して特異的である。一実施形態において、そのサンプルは、Ｔ細胞を含み、その足場／デバイスは、例えば、０．５日間、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２５日間、３０日間、３５日間、４０日間、４５日間、５０日間、６０日間、またはこれより長い期間にわたってそのサンプルと接触され、その足場の中の細胞は、前述の技術のうちの１種またはこれより多くを使用して分析される。例えば、自己免疫疾患を診断する状況では、分析される細胞は、活性化Ｔ細胞を含み得る。がん診断の状況では、分析される細胞は、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含み得る。病原体による疾患の状況では、分析される細胞は、その病原体を特異的に排除するＴ細胞を含み得る（例えば、細胞内病原体の場合にはＴｈ１細胞を、および細胞外病原体の場合にはＴｈ２細胞を分析することによる）。

【０３６９】

被験体は、動物、好ましくは哺乳動物または鳥類である。特に好ましくは、その被験体は、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、スイギュウおよびウマからなる群より選択される。最も好ましくは、その被験体は、ヒトである。任意の免疫細胞は、その疾患または障害の診断において使用され得る。好ましくは、診断は、リンパ球、例えば、Ｔ細胞で行われる。

【０３７０】

分析工程は、任意の慣用的方法を使用して行われ得る。よって、一実施形態において、分析工程は、自己免疫疾患に対して特異的である免疫細胞の数を決定する工程を包含し得る。任意の慣用的技術は、免疫細胞の抗原結合特異性を決定するために使用され得る（例えば、細胞サンプルを抗原被覆表面上に負荷し、非特異的に結合した細胞を洗い流し、そして抗原特異的細胞の数を（結合した細胞を放出することによる遊離形態、または結合した形態のいずれかで）、検出薬剤（例えば、抗原特異的細胞上に位置する細胞表面エピトープに結合する抗体）を使用して定量する）。別の実施形態において、分析工程は、抗原特異的免疫細胞の物理的または生物学的特徴を決定する工程を包含し得る。物理的特徴の例としては、例えば、サイズ、形状、反射率、形態、密度が挙げられる。生物学的特徴の例としては、例えば、特定の細胞表面マーカーの発現、サイトカインの分泌、特定の抗原または薬剤に対する反応性、遺伝子発現のパターンが挙げられる。

【０３７１】

分析工程は、相関工程に結びつけられ得、ここでその分析工程の結果は、目的のパラメーターと相関される。パラメーターの代表的なタイプとしては、存在（または疾患の非存

在）、疾患のタイプ（例えば、非攻撃的な自己免疫障害に対して攻撃的；創薬不能な（ｎｏｎ－ｄｒｕｇｇａｂｌｅ）疾患に対して創薬可能な疾患、例えば、抗生物質耐性細菌感染に対して抗生物質感受性、免疫療法感受性がんに対して免疫療法耐性）、疾患のステージ、疾患の進行／退縮（経時的な）などが挙げられる。一実施形態において、そのパラメーターは、疾患の存在または非存在に関する（これは、一対の用語において表され得る）。別の実施形態において、そのパラメーターは、疾患のステージ分類に関する（これは、数値スケール（例えば、ステージＩ～ＩＶ（ステージＩＶは、最高である）で表され得る）。なお別の実施形態において、そのパラメーターは、疾患の発生のオッズまたは可能性（例えば、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、２倍、３倍、５倍、１０倍、２０倍または２０倍超）に関する。

【０３７２】

前述の診断法において、そのパラメーターは、ベースライン値と比較され得る。そのベースライン値は、例えば、健康な被験体の集団において予め決定された値であり得る。例えば、目的の抗原が関節リウマチ（ＲＡ）抗原である場合、健康な被験体におけるＲＡ特異的抗体（またはＴ細胞）のベースラインレベルは、相関工程において使用され得る。あるいは、そのベースライン値は、適切なコントロールを使用して実験で同定され得る。当業者は、慣用的技術を使用して、種々の被験体群の間を相関し得、そして／または推論を導き得る。

【０３７３】

よって、本発明の実施形態は、被験体のサンプルと、自己免疫疾患、がん疾患、または病原体による疾患に対して特異的な抗原を含む本発明の足場とを接触させ、そしてその中に含まれる免疫細胞を分析することによって、被験体において自己免疫疾患、がん、または病原体による疾患を検出または診断することに関する。その接触させる工程は、インビボで（例えば、その足場を被験体に移植することによって）またはエキソビボで（例えば、被験体から引き抜かれた血液サンプルをその足場とともに培養することによって）行われ得る。ある種の実施形態において、その分析工程は、その免疫細胞をその足場から、慣用的技術を使用して先ず除去することによって、すなわち、エキソサイチュ分析を介して行われ得る。例えば、穏やかな界面活性剤および酵素は、その足場から細胞を取り除くために使用され得る。あるいは、その検出／分析工程は、その足場から細胞を除去することなく、すなわち、インサイチュ分析を介して行われ得る。

【０３７４】

関連する実施形態は、被験体において疾患の進行をモニターするための方法に関する。上記方法は、被験体のサンプルと疾患に対して特異的な抗原を含む本発明の足場とを請求項食させる工程およびその中に含まれる免疫細胞を分析する工程を包含する。デバイスの中に含まれる免疫細胞の数／タイプは、その疾患の進行に関する価値のあるキューを提供し得る。あるいは、被験体が治療介入を受けた場合、類似の方法は、疾患の治療および／または疾患の管理をモニターするために使用され得る。

【０３７５】

前述の方法は、自己免疫障害、がん、病原体による疾患などの進行／治療をモニターするために使用され得る。好ましくは、診断法において使用される免疫細胞は、Ｔ細胞である。

【０３７６】

自己免疫障害の状況において、疾患の進行は、自己反応性Ｔ細胞の数および／またはタイプを分析することによってモニターされ得る。分析の結果に依存して、介入および／または治療の方法は、症状の重篤度を最小限にするためにデザインされ得る。他の例では、防止的方法がとられ得る（食事、栄養および／または他の生活様式の変化に関して被験体へ推奨することを含む）。

【０３７７】

本明細書で記載される実施形態はさらに、疾患を処置するための新規な組成物を考案および生成するための方法に関する。上記方法は、疾患特異的抗原を含む本発明の足場を被

験体に投与する工程であって、その足場は、次いで、疾患に対して特異的な免疫細胞を操作する工程、そのデバイスにおいて操作された免疫細胞を必要に応じて単離し、富化し、そして拡大する工程、および次いで、その免疫細胞を被験体に投与し戻す工程を包含する。あるいは、このような免疫細胞に由来する生成物は、被験体に投与され得る。免疫細胞に由来する生成物の例としては、核酸（このような核酸を含むベクターおよび細胞を含む）、ペプチド、タンパク質、抗体、サイトカインなどが挙げられる。

【０３７８】

好ましくは、その疾患は、自己免疫疾患である。一実施形態において、前述の方法によって単離された（そして本明細書で記載されるように培養物中で必要に応じて拡大された）自己反応性Ｔ細胞は、インサイチュまたはエキソサイチュで不活性化され得る。Ｔ細胞を不活性化するための方法は、当該分野で公知である。例としては、化学的不活性化または照射が挙げられるが、これらに限定されない。自己反応性Ｔ細胞は、当業者に公知の多くの技術（冷凍保存が挙げられるが、これらに限定されない）を使用して、不活性化の前または後のいずれかに、保存され得る。以下に記載されるように、その組成物は、自己免疫患者において自己反応性Ｔ細胞を枯渇させるためにワクチンとして使用される。

【０３７９】

本明細書で記載される実施形態はさらに、前述の方法によって生成される組成物およびワクチンに関する。その組成物は、薬学的組成物であり得、これは、当該分野で周知の方法を使用して生成され得る。疾患または障害の処置において前臨床上のおよび臨床上の治療剤として使用される薬学的組成物は、診断および処置の許容された原理を使用して、当業者によって生成され得る。

【０３８０】

一実施形態において、ワクチンは、Ｖβ－Ｄβ－Ｊβ遺伝子使用法の均質な（「モノクローナル」な）または不均質な（「ポリクローナル」な）パターンを含む自己反応性Ｔ細胞を含み得る。臨床研究は、自家モノクローナルＴ細胞ワクチン接種を受ける自己免疫患者が、自己反応性Ｔ細胞に対する免疫において徐々に低下を示し得ることを示す。いくつかの症例では、自己反応性Ｔ細胞の再出現は、異なるクローン集団から起こり得、このことは、Ｔ細胞が継続している疾患プロセスと潜在的に関連するクローンシフトまたはエピトープ拡大（ｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇ）を受け得ることを示唆する。クローンシフトまたはエピトープ拡大は、自己反応性Ｔ細胞によって媒介される自己免疫疾患における問題であり得る。自己反応性Ｔ細胞の複数の集団を枯渇し得るポリクローナル自己反応性Ｔ細胞を含むワクチンは、クローンシフトまたはエピトープ拡大に伴う問題を回避し得る。望ましいＴ細胞を含む本発明の組成物／ワクチンは、薬学的に受容可能なキャリアとともに提供され得る。Ｔ細胞の凍結乾燥調製物が、同様に提供され得る。

【０３８１】

ＩＶ．キット／デバイス

ある種の実施形態において、本発明は、１つまたは別個の区画の中に本発明の足場を含むキットを提供する。そのキットは、さらなる成分をさらに含み得る。そのキットは、診断または治療適用のために足場を製剤化するための説明書を必要に応じて含む。そのキットはまた、種々の障害および／または疾患の治療または診断において、そのキット構成要素を、個々にまたは一緒に、のいずれかで使用するための説明書を含み得る。

【０３８２】

関連する実施形態において、本発明は、本発明の足場を、目的の操作された細胞を選択、培養、拡大、維持、および／または移植するための試薬とともに含むキットを提供する。Ｔ細胞、Ｂ細胞および抗原提示細胞のための細胞選択キット、培養キット、拡大キット、移植キットの代表的な例は、当該分野で公知である。

【０３８３】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証されるが、実施例は限定すると解釈されるべきではない。本出願全体を通じて引用された全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容全体、ならびに図面は、本明細書に参考として援用される。

【実施例】
【０３８４】
実施例１：足場の構築およびアセンブルされた構造の顕微鏡分析
抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を、以下で記載される方法論を使用してアセンブルした。簡潔には、高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層を先ず提供した。その上に、種々のＴ細胞ホメオスタシス因子、例えば、インターロイキン（例えば、ＩＬ２）および／またはサイトカイン（例えば、ＴＧＦ－β）を、必要に応じて負荷する。ある種の実施形態において、ホメオスタシス因子をそのＭＳＲ層上に負荷することは、好ましいことであり得る。次いで、連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を、基部層上に層化し、それによって、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を生成した。そのホメオスタシス因子がＭＳＲ層上に直接負荷されない場合、それらは、ＳＬＢペイロードをＭＳＲ層の一番上に適用した後に負荷され得る。次いで、遮断薬剤（例えば、ＢＳＡ）を適用して、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場における非特異的相互作用部位を遮断し得、その後、１種またはこれより多くのＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子を、ＭＳＲ－ＳＬＢ足場上に負荷する。位相差顕微鏡（ここでは、顕微鏡にデジタルカメラを装備した）を用いたメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の構造を使用して、図１に示される構造の画像を得た。上のパネルは、脂質：ＭＳＲ比　１：２０での脂質（緑色）およびメソポーラスシリカマイクロロッド（灰色）の合成写真を示す（スケール＝２００μｍ）。中央のパネルは、脂質：ＭＳＲ比　１：４での脂質（緑色）およびメソポーラスシリカマイクロロッド（灰色）の合成写真を示す（スケール＝２００μｍ）。下のパネルは、より高い倍率において、ＭＳＲと会合した脂質の位相差顕微鏡の合成画像を示す（スケール＝２０μｍ）。
【０３８５】
抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）の特徴は、脂質のタイプおよび脂質の含有量に依存することが見出された。図２Ａは、所望の体系および／または足場の特性を達成するために使用され得る脂質の列挙（例えば、ジオレオイル－ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）；パルミトイル－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）；またはジステアロイル－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ））を提供する。さらに、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物上に層化された脂質の保持が、その脂質のタイプおよび／または含有量に依存することが見出された（図２Ｂを参照のこと）。次に、本発明の足場における脂質二重層の組織化を、蛍光分析を使用して研究した。図２Ｃは、２週間（１４日間）の期間にわたる、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中にＤＯＰＣ、ＰＯＰＣまたはＤＳＰＣを含む種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の相対的蛍光の変化を示す。図２Ｄは、３７℃において２週間（１４日間）の期間にわたる、完全ロズウェルパーク記念研究所培地（ｃＲＰＭＩ）中にＤＯＰＣ、ＰＯＰＣまたはＤＳＰＣを含む種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の相対的蛍光の変化を示す。
【０３８６】
さらに、種々の時点での種々のＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の安定性を、３日間、７日間、および１４日間にわたってＰＢＳ中で足場を懸濁することによって調査した。次いで、その足場体系および／または構造を、位相差蛍光顕微鏡法で分析した。結果を図３に示す。上のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＤＯＰＣの安定性を示す；中央のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＰＯＰＣの安定性を示す；そして下のパネルは、ＭＳＲ－ＳＬＢ組成物中のＤＳＰＣの安定性を示す。
【０３８７】
その後、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造のアセンブリおよび特徴を、位相差顕微鏡法で経時的に研究した。結果を図４Ａ～４Ｅに示す。図４Ａは、脂質組成物の退色前（「ｐｒｅ」）、脂質組成物の退色時（ｔ＝０）および脂質組成物の退色の５分後（ｔ＝５分）に、高倍率（スケール＝２μｍ）において撮影した、メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）と会合した脂質の位相差共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。図４Ｂは、光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）の変化を時間とともに示す。そのソースは、領域（２）に示され、その吸い込みは、領域（３）に示され、正規化点は、領域（１）として示される。差次的分布は、

退色後の早い時点で最もよく認められ、およそ２分間（１２０秒間）で平衡に達した。右側の図は、正規化した画像から得られる場合、ＦＲＡＰの平均変化を示す平滑適合曲線を経時的に示す。図４Ｃおよび図４Ｄは、脂質組成物での退色前（ｐｒｅ）、退色時（ｔ＝０）および退色の３分後（ｔ＝３分）に、ＭＳＲ－ＳＬＢ流体構造の２セットの高解像度画像を示す。

【０３８８】

さらに、種々の脂質部分を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の構造的および機能的特性を、分光光度分析を使用して研究した。結果を、図５Ａおよび５Ｂに示す。図５Ａは、ホスホエタノールアミンビオチン（ビオチンＰＥ）（これは、ストレプトアビジン分子（例えば、ストレプトアビジンダイマー）に結合体化され、翻って、ビオチン化抗体（例えば、ビオチン化抗ＣＤ３抗体またはビオチン化抗ＣＤ２８抗体または別の特異的もしくは非特異的抗体）に結合体化される）を含むＰＯＰＣの脂質二重層を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物の模式的代表図を示す。図５Ｂは、ＭＰＳ（シリカ）、ＰＯＰＣ（脂質）、ＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材、ビオチン化ＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材（ストレプトアビジンの存在下または非存在下）、ならびにフィコエリトリンビオチン（ビオチンＰＥ）および／またはストレプトアビジンの存在下または非存在下でビオチン化抗体と一緒にＭＰＳ－ＰＯＰＣ複合材の分光光度分析を示す。吸光度の有意な増大は、ストレプトアビジンリンカーを介してビオチン化抗体に結合体化したホスホエタノールアミンビオチン（ビオチンＰＥ）を含むＭＳＲ－ＳＬＢ組成物において観察される（濃いバー；＊＊は、統計的有意性を示す）。Ｂ３Ｚハイブリドーマ細胞（これは、活性化に応答してβ－ガラクトシダーゼを生成する）の活性の増大は、全ての構成要素の存在とともに観察された。これは、ＡＰＣ－ＭＳが（Ａ）に示される構造を主にとることを示す。

【０３８９】

実施例２：ＡＰＣ－ＭＳの機能的特性の分析

ＩＬ－２のようなホメオスタシス因子の放出

メソポーラスシリカロッド（ＭＳＲ）および支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むＡＰＣ－ＭＳ（これはさらにＩＬ－２を含む）を、実施例１に記載される方法を使用して製造した。これらのＭＳＲ－ＳＬＢ組成物からのＩＬ－２の放出を、染色技術および／または結合アッセイを使用して分析した。その結果を、図６Ａおよび６Ｂに示す。図６Ａの電子顕微鏡写真に図示されるように、ＭＳＲの高表面積の孔は、ＩＬ２または他の可溶性ペイロードの潜在的吸着のために利用可能である（スケールバー＝１００ｎｍ）。１５日間の期間にわたる累積ＩＬ－２放出を示すプロット（図６Ｂ）は、本発明のＡＰＣ－ＭＳが、２週間の研究期間の全過程の間に、制御されかつ持続した様式でホメオスタシス因子（例えば、ＩＬ－２）を放出し得ることを示す。

【０３９０】

Ｔ細胞との会合

ＭＳＲ－ＳＬＢ足場を含む抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を、機能的Ｔ細胞を含む培地とともにインキュベートし、その足場へのＴ細胞の浸潤を、位相差顕微鏡法で分析した。その結果を図７Ａおよび７Ｂに示す。図７Ａは、生細胞色素および核色素で染色した全細胞を示す。その画像は、積み重なった高アスペクト比脂質被覆ＭＳＲ－ＳＬＢ足場の粒子内空間へと浸潤した生きているＴ細胞を示す。図５Ｂは、単一の色素で染色した細胞を示す（生細胞を示す）。

【０３９１】

実施例３：抗体負荷

次いで、ＭＳＲ－ＳＬＢを含むＡＰＣ－ＭＳに、種々の刺激分子、共刺激分子および／またはＴ細胞ホメオスタシス因子を負荷し、その得られた構造を、蛍光顕微鏡法で分析した。４種の異なるタイプのＭＳＲ－ＳＬＢ足場を分析した－（１）裸のＭＳＲ－ＳＬＢ足場（コントロール）；（２）結合体化抗体を含むＭＳＲ－ＳＬＢ；（３）ＩＬ－２を含むＭＳＲ－ＳＬＢ；および（４）結合体化抗体およびＩＬ－２を含むＭＳＲ－ＳＬＢ。顕微鏡写真を図８に示す（低解像度画像は左側にあり、高解像度画像は右側にある）。上のパ

ネル（グレースケール画像）は、前述のＭＳＲ－ＳＬＢ足場の各々の位相差顕微鏡画像を含む。下のパネルは、脂質蛍光を捕捉する画像とメソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）のグレースケール画像とを合成する。右側の画像は、高倍率でのＭＳＲ－ＳＬＢ足場を示す（スケールバー＝２０μｍ）。

【０３９２】

実施例４：抗体負荷ＡＰＣ－ＭＳの特性

Ｔ細胞拡大に対する抗体負荷ＡＰＣ－ＭＳの効果を、慣用的な細胞学的アッセイを使用して調査した。この目的のために、Ｔ細胞を種々のコントロールおよび実験用足場と接触させ、Ｔ細胞集団に対する各々の効果をＡｌａｍａｒ　ｂｌｕｅ色素（代謝活性を示す）によって測定し、ＩＦＮγ生成を、ＥＬＩＳＡによって測定した。コントロール足場は、偽（「モック」）、ＳＬＢ非含有足場（「なし」）、ＰＯＰＣ脂質のみを含む足場（「ＰＯＰＣ」）、ならびにＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせを含む足場を含む。その実験用足場は、抗体とともに、ＰＯＰＣおよびＩＬ－２の組み合わせを含む。抗体の３種の異なる用量（ＭＳＲ：抗体比が１：５０、１：２５および１：１０）を調査した。その結果を図９Ａおよび９Ｂに示す。図９Ａに示されるように、その実験用足場でのＴ細胞の３日間刺激は、Ｔ細胞拡大を有意に増大した。さらに、Ｔ細胞の拡大に対するその抗体の効果は、用量依存性であることが見出された。次に、同一の設定を使用して、Ｔ細胞によるＩＦＮγ生成を分析した。結果を図９Ｂに示す。実験用足場（ＰＯＰＣおよびＩＬ－２および抗体を含む）におけるＴ細胞のインキュベーションは、コントロール足場においてインキュベートされたＴ細胞と比較して、ＩＦＮγ分泌を大いに改善することが見出された。さらに、ＩＦＮγのＴ細胞依存性分泌に対するその抗体の効果は、用量依存性であることが見出された。

【０３９３】

代謝的に活性なＴ細胞の拡大に対する本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）の効果を、慣用的なサイトメトリー研究を使用して分析した。結果を、図１０および１１に示す。一般に、本発明の足場は、インビトロでのＴ細胞の迅速な拡大を促進することが見出された。この点において、図１０は、コントロールまたは実験用足場とのインキュベーションの際の初代Ｔ細胞の倍数拡大を示す。初代Ｔ細胞と本発明の組成物とのインキュベーションは、モック組成物またはＳＬＢなしの組成物と比較して、Ｔ細胞拡大を（再刺激ありまたはなしで）有意に誘導することを見出した。より重要なことには、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳおよびＩＬ－２の組成物と比較して、初代Ｔ細胞と本発明の足場とのインキュベーションは、７日目の再刺激の際に、測定可能なより強い増殖を生じた。図１１は、ＩＬ－２を負荷した本発明の足場（ＳＬＢ／ＩＬ２／ＡＢＳ）またはＩＬ－２を負荷したＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ－ＩＬ２）とともにインキュベートしたＴ細胞の代謝活性の棒グラフを示す（細胞あたりの相対的Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ（ＲＦＵ）によって測定）。有意により高い代謝活性を、５日目および７日目（再刺激の前）に、ならびに１１日目にも（非再刺激サンプルにおいて、緑色および橙色の棒によって示されるように）、本発明の足場とともにインキュベートしたサンプルにおいて観察した（左側の列）。７日目での再刺激は、Ｔ細胞の両方の群の代謝活性を増大した。すなわち、ＳＬＢ／ＩＬ２／ＡＢＳ組成物またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳ－ＩＬ２組成物とともにインキュベートしたものは、非再刺激細胞と比較して、以前に７日目に観察されたレベルを達成した。再刺激は、１３日目に、この時点でＴ細胞消耗を示す有糸細胞分裂活性を上昇させなかった。

【０３９４】

Ｔ細胞凝集物の形成に対する本発明の足場の効果をまた、顕微鏡分析を使用して研究した。結果を図１２に示す。左側パネルの画像は、０日目、３日目、および７日目に、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした際の脾臓Ｔ細胞の凝集物の顕微鏡写真を（４×倍率において）示す。右側パネルの画像は、０日目、３日目、および７日目に、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした際の脾臓Ｔ細胞の凝集物の光学顕微鏡写真を（１０×倍率において）示す（白のスケールバー＝１００μＭ）。本発明の足場（ＡＰＣ－ＭＳ）が、脾臓Ｔ細胞（マウス)のより大きなポ

リクローナル拡大を付与し、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳよりＴ細胞凝集物の形成を促進することが見出された。

【０３９５】

実施例５：別個のＴ細胞部分集団を刺激および拡大するための足場の使用

特定のＴ細胞部分集団を刺激および拡大することにおける本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物の有用性を、セルソーティング技術を使用して行った。脾臓Ｔ細胞を、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートし、細胞表現型の変化を（細胞表面マーカーの発現に基づいて）、インキュベーション後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）においてＦＡＣＳによって分析した。第１の実験において、ＣＤ４＋　およびＣＤ８＋　Ｔ細胞部分集団の相対的出現率の変化を、ＦＡＣＳを使用して分析した。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。第２の実験において、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＦｏｘＰ３＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を、第３の実験において、本発明の足場（ＡＰＣ－ＭＳ）またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ６２Ｌ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を、第４の実験において、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を、第５の実験において、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションの際のＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を、分析した。前述の実験の各々において、７日間日後に、第１のＴ細胞部分集団を、ＩＬ－２処理に供した一方で、第２のＴ細胞部分集団を再刺激し、その細胞懸濁物を、さらに６日間培養した。さらに、実験において使用したＡＰＣ－ＭＳおよびＤＹＮＡＢＥＡＤＳの両方は、刺激分子および共刺激分子の同一のレパートリーを含むことを担保した。

【０３９６】

第１の実験の結果を、図１３Ａおよび１３Ｂに示す。その結果は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションと比較して、本発明の足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とのインキュベーションが、１４日間のインキュベーション期間の終了時にポリクローナルＣＤ８＋　マウス脾臓Ｔ細胞のより大きな拡大を達成したことを示す。また、ＩＬ－２処理は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳで刺激した細胞の拡大を阻害した（約２０％低減）が、ＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートした細胞では、このような効果は観察されなかった。

【０３９７】

第２の実験では、四角形のゲートを適用して、種々の画分におけるＦｏｘＰ３＋　細胞の数および／または割合を計数した。その結果を図１４に示す。

【０３９８】

第３の実験（その結果を図１５に示す）では、本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳで達成されたものに類似および匹敵する様式で、ＣＤ６２Ｌ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を付与することが見出された。その結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ＣＤ６２Ｌ＋　細胞は、散布図の右側（上下）象限に出現する。その結果は、本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物が、標的Ｔ細胞部分集団を選択的に拡大するときに等しく有効であることを示し、その部分集団は、次いで、公知の細胞学的技術を使用して操作または製剤化され得る。

【０３９９】

第４の実験（その結果を図１６に示す）では、本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳで達成されたものに類似および匹敵する様式で、ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を付与することが見出された。その結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキ

ュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　細胞は、その散布図の右上の象限に出現する。その結果は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションと比較して、ＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーションが、１４日間のインキュベーション期間の終了時にポリクローナルＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞のより大きな拡大を達成したことを示す（ＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートしたサンプル中の約９０％　ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞　対　ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートしたサンプル中の約５０％　ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞の相対的割合）。

【０４００】

第５の実験（その結果を図１７に示す）では、本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳで達成されたものに類似および匹敵する様式で、ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　マウス脾臓Ｔ細胞の部分セットのポリクローナル拡大を付与することが見出された。その結果は、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーション（７日間のインキュベーション後に再刺激またはＩＬ－２処理を伴う）後の種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図の形態で示される。ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　細胞は、散布図の右上の象限に出現する。その結果は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションと比較して、ＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーションが、１４日間のインキュベーション期間の終了時にポリクローナルＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　Ｔ細胞のより大きな拡大を達成したことを示す（ＡＰＣ－ＭＳとともにインキュベートしたサンプル中の約９５％　ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　Ｔ細胞　対　ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートしたサンプル中の約８０％　ＣＤ８＋／グランザイムＢ＋　Ｔ細胞の相対的割合）。

【０４０１】

実施例６：サイトカイン分泌細胞を刺激および拡大するための足場の使用

マウス脾臓Ｔ細胞を、種々の継続期間（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）にわたって、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートした。７日間のインキュベーション後に、Ｔ細胞の第１の部分集団を、それぞれ、ＡＰＣ－ＭＳまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳで再刺激し、第２の部分集団を、ＩＬ－２で処理した。サイトカイン（ＩＦＮγ）分泌を、生物学的サンプル中のＩＦＮγ濃度を測定するための標準的アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡアッセイ）を使用して測定した。その結果（図１８に示される）は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションと比較して、ＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーションが、５日間のインキュベーション後にポリクローナルＣＤ８　マウス脾臓Ｔ細胞のより大きな拡大を達成したことを示す。この効果は、１３日間の実験期間全体を通じて維持された。脾臓Ｔ細胞と足場とのインキュベーションは、ＩＦＮγ分泌を増大させた。さらに、再刺激は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートした細胞の部分集団におけるＩＦＮγ分泌を増強することにおいて特に有効であることが見出された。

【０４０２】

実施例７：アネルギー、静止または弱ったＴ細胞を除去するための足場の使用

いくつかの新たな共刺激分子は、Ｂ７およびＣＤ２８ファミリーとのそれらの相同性に基づいて発見された。プログラムされた細胞死タンパク質１（ＰＤ－１；　ＵＮＩＰＲＯＴアクセッション番号Ｑ１５１１６）は、活性化Ｔ細胞上で発現され、２つのＢ７様リガンド、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２を有する（Ｆｒｅｅｍａｎら，　Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　１９２：１０２７－１０３４（２０００）；　Ｌａｔｃｈｍａｎら，　Ｎａｔ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２：２６１－２６８（２００１）；　Ｄｏｎｇら，　Ｎａｔ．　Ｍｅｄ．　５：１３６５－１３６９（１９９９）；　Ｔｓｅｎｇら，　Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　１９３：８３９－８４６（２００１））。ＰＤ－１は、アネルギーのマーカーであると考えられる（Ｃｈｉｋｕｍａら，　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　１８２（１１）：６６８２－９，　２００９）。従って、Ｔ細胞アネルギーを誘導することに対する本発明の

足場の効果を、フローサイトメトリーを使用して調査した。マウス脾臓Ｔ細胞を、種々の継続期間（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）にわたって、本発明の足場（ＡＰＣ－ＭＳ）またはＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにインキュベートした。７日間のインキュベーション後に、Ｔ細胞の第１の部分集団を再刺激し、第２の部分集団をＩＬ－２で処理した。各Ｔ細胞部分集団を、ＦＡＣＳ散布図を使用して細胞表面マーカーの発現を分析した。ここでＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＰＤ－１＋染色の強度を示す。その結果（図１９に示される）は、マウス脾臓Ｔ細胞の増大したＰＤ－１発現（すなわち、増大したアネルギー）を時間とともに示す。Ｔ細胞消耗を、両方の部分集団において達成した。その結果は、培養期間全体を通じて細胞の大部分がＰＤ－１陰性である（下側の象限）が、いくらかの細胞は、ＰＤ－１の発現をアップレギュレートすることを示す。ＡＰＣ－ＭＳでの再刺激は、ＰＤ－１発現を増大する傾向にある。注：ＩＬ－２への曝露は、全ての設定において提供された。

【０４０３】

実施例８：Ｔ細胞拡大を増大し、細胞活性を改善するための足場の使用

Ｔ細胞拡大および／または代謝活性を改善することにおける本発明のＡＰＣ－ＭＳ組成物の効果を、サイトメトリーを使用して行った。ヒト末梢血Ｔ細胞を、コントロール足場または実験用足場とともにインキュベートし、Ｔ細胞の数および／または代謝活性を、標準的アッセイ（例えば、トリパンブルー排除／血球計算板を使用する生細胞の手動での細胞計数、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイを使用して分析される代謝活性）を使用して種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）で測定した。結果を図２０Ａおよび２０Ｂに示す。Ｔ細胞拡大研究の場合には、コントロール足場は、偽組成物（表示：「モック」；黒い線で示した）および刺激物質抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８、ＩＬ－２の可溶性の遊離形態を含む組成物（「なし」；赤い線で示した）を含む一方で、実験用足場は、（１）ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（青い線）および（２）本発明の脂質二重層（ＳＬＢ）（緑の線）を含む。結果を図２０Ａに示す。１３日間の実験期間の終了時に、ＳＬＢとのインキュベーションが、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとのインキュベーションと比較して、Ｔ細胞のほぼ2倍大きな拡大を生じたことが認められ得る。より驚くべきことには、「なし」足場すら、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳの効果に匹敵する、Ｔ細胞に対する刺激効果を誘発した。

【０４０４】

初代Ｔ細胞の代謝活性に対する本発明の足場の効果に関する結果を、図２０Ｂに示す。脾臓Ｔ細胞を、コントロール足場または実験用足場とともにインキュベートし、Ｔ細胞の代謝活性を、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ染色を使用して種々の時点（ｔ＝０日間、５日間、７日間、１１日間および１３日間）で測定した。そのコントロール足場は、偽組成物（「モック」；「ｍ」）およびＳＬＢを含まない組成物（「なし」；「ｆ」）を含む一方で、その実験用足場は、（１）ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ（「ｄ」）および（２）脂質二重層（ＳＬＢ）（「ｓ」）を含む。１４日間の実験期間の終了時に、「モック」足場とインキュベートした細胞は全て消滅する一方で、実験用足場（ＳＬＢまたはＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）とともにインキュベートした細胞は、経時的に持続した成長および拡大を経験することが認められ得る。より重要なことには、本発明のＳＬＢ足場は、１４日間の実験期間の終了時に、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳによって付与される効果と比較して、Ｔ細胞のより良好な成長および代謝活性を促進した。

【０４０５】

実施例９：ヒトＴ細胞の拡大を促進するための足場の使用

被験体１（図２１Ａ）および被験体２（図２１Ｂ）から得たヒト血液サンプルを、コントロール足場（「モック」）、または列挙された抗ＣＤ３抗体－ムロモナブ（ＯＫＴ３）、ＣＤ３抗原／Ｔ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）複合体内のＣＤ３の１７～１９ｋＤ　εε鎖を認識する抗体（ＨＩＴ３ａ）およびＣＤ３ｅ内のＴＣＲ複合体の２０ｋＤａサブユニットを認識するモノクローナル抗体（ＵＣＨＴ１）を含む実験用足場とともにインキュベートした。３種の異なる投与量を、調査した－５μｇ（上のスライド）、１μｇ（被験体２の下のスライド）および０．５μｇ（被験体１の下のスライド）。各場合において、共

刺激を、抗ＣＤ２８抗体で提供し、ここで抗ＣＤ３抗体：抗ＣＤ２８抗体の比を１：１で維持した。細胞の倍数拡大を、種々の時点（ｔ＝０日間、７日間、１１日間および１３日間）で測定した。その結果（図２１Ａおよび２１Ｂに示す）は、より高い抗体投与量（５μｇ）において、全３種の抗ＣＤ３抗体が、ヒトＴ細胞の拡大を刺激できたことを示す。全ての場合に、Ｔ細胞集団の拡大は、最初は７日目までゆっくりであったが、その後、指数関数的に増大した。最高用量では、Ｔ細胞の数において６００～８００倍の増大が、実験期間の終了時（１３日目）に達成された。中間の投与量（１μｇ）では、ＯＫＴ３およびＨＩＴ３ａのみ（ＵＣＨＴ１ではない）が、Ｔ細胞拡大を刺激できた。ここでＴ細胞の数において３００～４００倍の増大が、実験期間の終了時（１３日目）に達成された。最低投与量（０．５μｇ）では、ＯＫＴ３のみ（ＵＣＨＴ１および／またはＨＩＴ３ａではない）が、Ｔ細胞拡大を刺激できた。ここでＴ細胞の数において６００～７００倍の増大が、実験期間の終了時（１３日目）に達成された。その結果は、拡大速度に対する抗ＣＤ３抗体クローンおよび抗体の用量の両方の効果を示す。

【０４０６】

次に、コントロール足場（「モック」）または列挙された抗ＣＤ３抗体－ＯＫＴ３、ＨＩＴ３ａ、およびＵＣＨＴ１を含む実験用足場とのインキュベーションの際のヒトＴ細胞のポリクローナル拡大を、フローサイトメトリーを介して分析した。結果を図２２に示す。ここで下のパネルは、刺激分子としての抗ＣＤ３抗体およびＴ細胞共刺激分子としての抗ＣＤ２８抗体の各々を含むＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーション後の種々の時点（ｔ＝８日間、１１日間および１４日間）でのＴ細胞集団のフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）散布図を示す。散布図のＸ軸上の値は、ＣＤ８＋染色の強度を示し、Ｙ軸上の値は、ＣＤ４＋染色の強度を示す。その散布図は、上のパネルの線グラフ（これは、前述の抗ＣＤ３抗体－ＯＫＴ３（丸）、ＨＩＴ３ａ（四角）およびＵＣＨＴ１（三角）を含むＡＰＣ－ＭＳとのインキュベーション後のＣＤ４＋　対　ＣＤ８＋　Ｔ細胞部分集団のパーセンテージにおける変化を示す）にまとめられる。２種の異なる抗体投与量を調査した－第１の用量５μｇ（１×希釈）および第２の用量０．５μｇ（１：１０×希釈）。その結果は、低い抗体投与量（１：１０×希釈；０．５μｇ）において、全３種の抗ＣＤ３抗体が、高い抗体濃度に対して低い抗体濃度を使用して、ＣＤ８＋特異的Ｔ細胞を富化できたことを示す。ＣＤ８＋特異的Ｔ細胞の数において３～４倍の増大が、実験期間の終了時（１４日目）に達成された。例えば、ＣＤ８＋　Ｔ細胞の相対的出現率は、実験の開始時には２０％であったが、１４日目には、約６０％～８０％に増大した。さらに、抗ＣＤ３抗体ＵＨＣＴ１およびＯＫＴ１は、等しく有効であり、ＣＤ８＋　Ｔ細胞の拡大を促進することにおいて抗ＣＤ３抗体ＨＩＴ３ａより優れていることが見出された。高い（５μｇ）抗体用量では、全体のＴ細胞集団におけるＣＤ８＋：ＣＤ４＋の比は、１４日目に変化しなかった（またはさらに低下した）。その結果は、ＣＤ８＋特異的Ｔ細胞の拡大に対する抗ＣＤ３抗体クローンおよびその抗体の用量の両方の効果を示す。

【０４０７】

実施例１０：特異的ヒトＴ細胞部分集団の拡大を促進するための足場の使用

ヒト血液サンプルを、列挙された抗ＣＤ３抗体－ムロモナブ（ＯＫＴ３）、ＨＩＴ３ａおよびＵＣＨＴ１を１×投与量（５μｇ）において含む実験用足場とともにインキュベートした。各場合において、共刺激を、抗ＣＤ２８抗体で提供した。Ｔ細胞の倍数拡大を、１４日間後に測定した。全生細胞におけるＣＤ６２ＬおよびＣＣＲ７の発現を上のパネルに示し、ゲート制御したＣＤ８＋　細胞におけるこれらのマーカーの発現を下のパネルに示す。その結果（図２３に示す）は、全３種の抗ＣＤ３抗体がヒトＴ細胞の別個の部分集団の拡大を刺激できたことを示す。驚くべきことに、その種々の本発明の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）で拡大した細胞の大部分は、インキュベーションの１４日間後ですら、ＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋を保持する。その結果は、エキソビボでの拡大後に拡大したＴ細胞のインビボで保持された機能性を示す。よって、抗原提示細胞模倣足場を使用して、ＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞（例えば、メモリー細胞）の別個の部分集団を選択的に拡大および維持することは可能である。

【０４０８】
さらに、ＯＫＴ３を含むＡＰＣ－ＭＳ足場は、ＵＣＨＴ１および／またはＨＩＴ３ａを含む足場と比較して。ＣＤ６２Ｌ＋ＣＣＲ７＋　Ｔ細胞を拡大および／または保持することにおいて特に有効であった。
【０４０９】
実施例１１：抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）を使用するＴ細胞のエキソビボでの拡大
Ｔ細胞の養子細胞移入（ＡＣＴ）は、がんおよび感染性疾患に関する有望な処置である。しかし、エキソビボでのＴ細胞拡大に関する現在のアプローチ（ＡＣＴにおける重量な工程）は、最適状態には及ばない拡大速度および細胞の機能性の制限を頻繁に生じる。そこで、本発明者らは、流体脂質二重層上に局所的に所定の密度にあるＴ細胞レセプター刺激および共刺激に関するキューを提示するメソポーラスシリカマイクロロッド－支持脂質二重層を開発し、これらのキューが抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって天然に提示される方法に類似した、可溶性インターロイキン－２の放出制御を促進した。細胞培養では、ＡＰＣ模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）へと形成される材料は、マウスおよびヒトＴ細胞の活性化および浸潤を促進した。ＡＰＣ－ＭＳは、２週間後に市販の拡大ビーズより２～１０倍大きなポリクローナルＴ細胞拡大、および機能的細胞傷害性Ｔ細胞の希な部分集団の強力な抗原特異的拡大を促進した。この研究は、ＡＣＴのために機能的Ｔ細胞を迅速に拡大する新たなプラットフォームを示す。
【０４１０】
Ｔ細胞を使用する養子細胞移入（ＡＣＴ）は、種々の悪性腫瘍および感染性疾患の処置に関する有望なアプローチである（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．＆Ｒｅｓｔｉｆｏ，Ｎ．Ｐ．Ｓｃｉｅｎｃｅ３４８，６２－６８（２０１５）；Ｊｕｎｅ，Ｃ．Ｈ．らＳｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ７（２８０）：２８０ｐｓ７（２０１５）；およびＦｅｓｎａｋ，Ａ．Ｄ．らＮａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｃａｎｃｅｒ １６，５６６－５８１（２０１６）を参照のこと）。しかし、機能的Ｔ細胞の迅速なエキソビボ拡大（ＡＣＴのためのＴ細胞の生成において重要な工程）は、未だに大きな難題である。Ｔ細胞活性化は、３種のシグナルを要求する：（１）Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）刺激、（２）共刺激、および（３）プロサバイバルサイトカイン（ｐｒｏ－ｓｕｒｖｉｖａｌ ｃｙｔｏｋｉｎｅ）（Ｈｕｐｐａ，Ｊ．Ｂ．＆Ｄａｖｉｓ，Ｍ．Ｍ．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３，９７３－９８３（２００３））。身体において、これらのシグナルは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって提供され、これら細胞は、特定の時空間パターンにおいてこれらのキューをＴ細胞に提示する（Ｈｕｐｐａ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（２００３）；Ｌｅｅ，Ｋ．－Ｈ．らＳｃｉｅｎｃｅ ３０２，１２１８－１２２２（２００３）；Ａｌａｒｃｏｎ，Ｂ．らＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １３３，４２０－４２５（２０１１）；およびＭｉｎｇｕｅｔ，Ｓ．らＩｍｍｕｎｉｔｙ ２６，４３－５４（２００７））。種々のアプローチが、ＡＣＴのためにＴ細胞をエキソビボで拡大するために使用され、合成の人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）は、特に便利である（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｅｓｔｉｆｏ（２０１５）；Ｈａｓａｎ，Ａ．らＡｄｖａｎｃｅｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２０１５（２０１５）；Ｈｏｌｌｙｍａｎ，Ｄ．らＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ（Ｈａｇｅｒｓｔｏｗｎ，Ｍｄ．：１９９７）３２，１６９（２００９）；Ｍａｕｓ，Ｍ．Ｖ．らＮａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０，１４３－１４８（２００２）；Ｚａｐｐａｓｏｄｉ，Ｒ．らＨａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａ ９３，１５２３－１５３４（２００８）；Ｐｅｒｉｃａ，Ｋ．らＡＣＳ Ｎａｎｏ ９，６８６１－６８７１（２０１５）；Ｍａｎｄａｌ，Ｓ．らＡＣＳ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ １０，４８５－４９２（２０１４）；Ｓｔｅｅｎｂｌｏｃｋ，Ｅ．Ｒ．＆Ｆａｈｍｙ，Ｔ．Ｍ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １６，７６５－７７２（２００８）；Ｆａｄｅｌ，Ｔ．Ｒ．らＮａｔｕｒｅ

Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９，６３９－６４７（２０１４）；Ｓｕｎｓｈｉｎｅ，Ｊ．Ｃ．らＢｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ３５，２６９－２７７（２０１４）；Ｆａｄｅｌ，Ｔ．Ｒ．らＮａｎｏ ｌｅｔｔｅｒｓ ８，２０７０－２０７６（２００８）；Ｍｅｙｅｒ，Ｒ．Ａ．らＳｍａｌｌ １１，１５１９－１５２５（２０１５）；およびＳｔｅｅｎｂｌｏｃｋ，Ｅ．Ｒ．らＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２８６，３４８８３－３４８９２（２０１１））。現在、ＣＤ３に対する活性化抗体（ａＣＤ３；ＴＣＲ刺激因子）およびＣＤ２８に対する活性化抗体（ａＣＤ２８；共刺激キュー）で官能化された市販のマイクロビーズ（ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ）が、Ｔ細胞を拡大するための唯一のＦＤＡ承認の合成系である（Ｈｏｌｌｙｍａｎら（２００９））。これらのビーズは、外因性インターロイキン－２（ＩＬ－２）補充を用いてポリクローナルＴ細胞活性化を促進する。これらの培養物は、Ｔ細胞に３種の重要なシグナルを提供するが、これらのシグナルが提示される状況は、それらがＡＰＣによって天然で提示される方法の代表ではない。この文脈上の不一致は、制限されるかまたは調節不全の機能とともに、最適状態に及ばないＴ細胞拡大速度およびＴ細胞生成物をもたらし得る（Ｚａｐｐａｓｏｄｉら（２００８）；Ｆａｄｅｌら（２０１４）；Ｌｉ，Ｙ．＆Ｋｕｒｌａｎｄｅｒ，Ｒ．Ｊ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ８，１（２０１０）；およびＪＪｉｎ，Ｃ．らＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｍｅｔｈｏｄｓ ＆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １（２０１４））。さらに、これらのビーズは、非常に機能的な治療用Ｔ細胞の生成にとって重要であり得る、多数のセットのキューの提示には従いにくい（Ｈａｓａｎら（２０１５）；ａｎｄ Ｈｅｎｄｒｉｋｓ，Ｊ．らＮａｔｕｒｅ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １，４３３－４４０（２０００））。

【０４１１】

高アスペクト比メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）上に形成された支持脂質二重層（ＳＬＢ）から構成される複合材が開発された（Ｋｉｍ，Ｊ．らＮａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３３，６４－７２（２０１５）；およびＬｉ，Ｗ．Ａ．らＢｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ８３，２４９－２５６（２０１６））。そのＳＬＢは、流体脂質二重層上で所定の密度においてＴ細胞活性化キューの組み合わせの提示を可能にした一方で、ＭＳＲは、近くのＴ細胞への可溶性のキューの持続した傍分泌放出を促進した。従って、複合材ＭＳＲ－ＳＬＢは、天然のＡＰＣに類似の状況で、Ｔ細胞への表面のおよび可溶性のキューの提示を可能にした。細胞培養物において、その高アスペクト比ロッドは沈んで積み重なって、３Ｄ足場構造を形成した。Ｔ細胞活性化キューで官能化されたＭＳＲ－ＳＬＢから形成された足場は、ＡＰＣ模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）といわれる。ＡＰＣ－ＭＳは、２週間後に、市販のＤＹＮＡＢＥＡＤＳより初代マウスおよびヒトＴ細胞の２～１０倍大きなポリクローナル拡大を促進した。ＡＰＣ－ＭＳはまた、機能的マウスおよびヒト細胞傷害性Ｔ細胞の強い抗原特異的拡大を促進した。特に、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）関連抗原を提示するＡＰＣ－ＭＳは、抗原特異的様式で、ヒトＴ細胞の希な部分集団を拡大および富化した。全体的に、ＡＰＣ－ＭＳは、ＡＣＴのために、時空間パターンにおいて非常に機能的なＴ細胞の迅速な拡大を可能にし得る融通性がありかつ調整可能なプラットフォーム技術を表す（Ｈｕｐｐａ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（２００３）；Ｌｅｅら（２００３）；Ａｌａｒｃｏｎら（２０１１）；およびＭｉｎｇｕｅｔら（２００７））。

【０４１２】

ＡＰＣ－ＭＳのアセンブリおよび特徴づけ

ＡＰＣ－ＭＳを、Ｔ細胞活性化（図２５Ａ）のために、ポリクローナルおよび抗原特異的拡大（図２５Ｂ）に特有のキューを使用して調製した。長さ８８μｍ、直径４．５μｍ（アスペクト比　約２０）、および１０．９ｎｍの孔という平均寸法を有する高アスペクト比ＭＳＲを、先に記載されるように合成し（Ｋｉｍら（２０１５）；およびＬｉら（２０１６））（図２６Ａを参照のこと）、ＩＬ－２を吸着させた。

【０４１３】

所定の量のビオチン化脂質を含むリポソーム（１４０ｎｍ）を調製し、１Ｌ－２負荷ＭＳＲ上に被覆し、ＭＳＲ－ＳＬＢを形成した（図２６Ｂを参照のこと）。次に、ＴＣＲ活性化および共刺激のビオチン化キューを、ストレプトアビジン中間体を介してＭＳＲ－ＳＬＢ表面に付着させた。細胞培養物では、３Ｄ足場は、ロッドの沈殿およびランダムな積み重なりを通じて自発的に形成し、ＡＰＣ－ＭＳを形成した。Ｔ細胞は、足場の粒子内空間に浸潤した。全体としては、足場は、脂質二重層の表面上でＴＣＲ活性化および共刺激のキューを提示し、これらのキューが天然のＡＰＣによってＴ細胞に提示される方法に類似する傍分泌様式で浸潤しているＴ細胞へと可溶性ＩＬ－２を経時的に放出する（Ｈｕｐｐａ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（２００３）を参照のこと）。

【０４１４】

ＭＳＲを、リン脂質１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）で被覆した。ＰＯＰＣは、哺乳動物の細胞膜のモデルとして一般に使用される（Ｊｅｒａｂｅｋ, Ｈ.Ｒ.ら Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １３２, ７９９０－７（２０１０）；およびＴｏｒｒｅｓら Ｌａｂ ｏｎ ａ Ｃｈｉｐ １３, ９０－９９（２０１３））。低い脂質：ＭＳＲ比では、ＭＳＲの脂質媒介性凝集が観察された（図２７Ａ）。その一方でより高い脂質：ＭＳＲ比では、脂質被覆ＭＳＲは、十分に分散した単一粒子状態で維持された（図２７Ｂ）。このより高い脂質：ＭＳＲ比では、投入したＰＯＰＣのうちの３４．１±０．９％が、ＭＳＲと最初に会合し、ＰＯＰＣ被覆は、細胞培養条件において経時的にゆっくりと失われた（図２８Ａ）。なぜならＰＯＰＣ被覆ＭＳＲが分解したからである（図２８Ｂ）。ＭＳＲはまた、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）および１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）で成功裡に被覆された。ＭＳＲと会合した脂質の量は、脂質二重層の中により高い飽和度の脂質がより密に充填されていることにおそらく起因して、脂質の飽和度に逆に関連した。種々の脂質被覆の安定性において有意差は観察されなかった。ＭＳＲ脂質被覆が連続しているか否かを評価するために、流体ＳＬＢ構造、光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）研究を、発蛍光団タグ化脂質を使用して行った。脂質被覆ＭＳＲの光退色領域における蛍光の回復および退色したロッドにわたる蛍光の同時の正規化が観察された。これは、ＭＳＲ脂質被覆が連続しており、流体ＳＬＢであることを示した（図３９Ａおよび３９Ｂ）。

【０４１５】

可溶性キューの負荷および放出、ならびに表面キューの負荷もまた、分析した。ＭＳＲは、分子ペイロードの表面吸着に利用可能な非常に高い表面積を有する（Ｋｉｍら（２０１５））。そして５００μｇのＭＳＲに２μｇのＩＬ－２（０．０４ｍｇ／ｍｌ ＩＬ－２）を負荷した場合、その投入したＩＬ－２のうちの５０±１％が、ＭＳＲとともに保持された。その負荷したＩＬ－２はその後、９日間にわたって制御された様式で放出された。その傾向は、１フェーズ指数関数を使用して十分に近似できた（R^2＝０．９８）。これは、ＩＬ－２の放出が一次速度論に従ったことを示す（図２８Ｅ）。

【０４１６】

脂質製剤の中に組み込まれたビオチン化脂質種の量を変化させる場合の表面キューの付着をまた、分析した。ストレプトアビジンを、それぞれのＭＳＲ－ＳＬＢ製剤に関してビオチン化脂質基のモル量の３０％において添加し、そしてビオチン化ＩｇＧを表面キューの代用として添加した。飽和時に、種々のＭＳＲ－ＳＬＢ製剤に負荷できたビオチン化ＩｇＧの最大量は、約１０倍異なった（図２８Ｆ）。この差異は、種々のＭＳＲ－ＳＬＢ製剤におけるビオチン化脂質の量における相対的差異と一致する。これは、表面に結合したＩｇＧの密度が、被覆している脂質製剤中の接着性脂質の量を定義することによって正確に制御できたことを示す。全てのその後の実験において、ＭＳＲ－ＳＬＢを、記載されるように表面キューで飽和させ、相対的表面キュー密度を、製剤中のビオチン化脂質のモル％によって記載する。

【０４１７】

足場表面上の活性化キューの提示がＴ細胞相互作用を促進したことを確認するために、初代Ｔ細胞を、表面Ｔ細胞キューなしのＭＳＲ－ＳＬＢ、または完全ＡＰＣ－ＭＳのいずれかとともに培養した。Ｔ細胞は、表面Ｔ細胞キューなしのＭＳＲ－ＳＬＢを概して無視したのに対して、それらは、ＡＰＣ－ＭＳと強く相互作用し、足場の構造を再組織化して、広範囲の高密度細胞－材料クラスターを形成した（図２８Ｇおよび図２９）。

【０４１８】

初代マウスおよびヒトＴ細胞のポリクローナル拡大

初代マウスＴ細胞を、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかとともに培養した。ＡＰＣ－ＭＳとの培養は、大きな細胞－材料クラスターの形成をもたらし、これらのクラスターのサイズおよび出現率は、Ｄｙｎａｂｅａｄ培養物においてよりＡＰＣ－ＭＳ培養物においてより高かった（図３０Ａ）。ＡＰＣ－ＭＳとの培養は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳとの培養より２倍超の高い拡大を促進した（図３０Ｂ）。興味深いことに、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳは、培養期間にわたってＴ細胞集団の中程度のＣＤ８に傾いた非対称性を促進した一方で、ＡＰＣ－ＭＳは、全Ｔ細胞のうちの９５％超がＣＤ８＋であるように促進した（図３０Ｃおよび図３１）。ＡＰＣ－ＭＳを使用して拡大したエフェクターＣＤ８＋Ｔ細胞は、培養期間にわたって、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳで拡大したＣＤ８＋　Ｔ細胞よりも、細胞傷害性メディエーターグランザイムＢをより迅速にかつより大きな程度までアップレギュレートした（図３２Ａ）。Ｄｙｎａｂｅａｄで拡大したおよびＡＰＣ－ＭＳで拡大した両方のＴ細胞生成物において、ＣＤ４＋　ＦｏｘＰ３＋　細胞の拡大は観察されなかった（図３２Ｂ）。重要なことに、迅速な拡大速度が観察されたにも関わらず、ＡＰＣ－ＭＳで拡大したＴ細胞のうちの大部分は、消耗マーカーＰＤ－１に関して陰性のままであった（図３２Ｃ）。

【０４１９】

ＡＰＣ－ＭＳ製剤をまた、初代ヒトＴ細胞のポリクローナル拡大に関して評価した。初代ヒトＴ細胞をＡＰＣ－ＭＳとともに培養すると、大きな細胞－材料クラスターの形成もまたもたらされ、これらのクラスターのサイズおよび出現率は、Ｄｙｎａｂｅａｄ培養物中よりＡＰＣ－ＭＳ培養物中においてより大きかった。これらのクラスターの安定性および持続性は、表面キュー密度および最初の物質投入量の両方に依存することが観察された（図３０Ｄ）。その試験したＡＰＣ－ＭＳ製剤のうちの全てを用いての１４日間の培養は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを用いるより２倍～１０倍の間の大きな拡大をもたらした（図３０Ｅ）。興味深いことに、より高い量のＴ細胞刺激（より高い表面キュー密度またはより高い最初の物質の質量のいずれかを介する）を含むＡＰＣ－ＭＳ製剤は、１４日間の培養後に、極めてＣＤ４に偏った非対称性を促進した。対照的に、他のＡＰＣ－ＭＳ製剤（Ｆ４）に対して低い全体量のＴ細胞刺激を含むＡＰＣ－ＭＳ製剤は、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳに匹敵する、よりバランスのとれたＣＤ４＋およびＣＤ８＋　拡大を促進した（図３０Ｆ）。試験したＡＰＣ－ＭＳ製剤の中で、その製剤中のＴ細胞刺激の総量と培養期間終了時に消耗マーカーＰＤ－１およびＬＡＧ－３を共発現した細胞の出現率との間には、正の相関が観察された。顕著なことには、２週間の培養期間にわたっておよそ１０倍高い拡大があったにも関わらず、ＰＤ－１およびＬＡＧ－３共発現細胞の低い出現率（＜５％）が、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳに類似する低Ｔ細胞刺激ＡＰＣ－ＭＳ製剤（Ｆ４）で観察された。しかし、ＰＤ－１およびＬＡＧ－３を共発現する細胞のより高い出現率が、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳ条件において７日目に観察された（図３０Ｇ）。リンパ系ホーミング分子ＣＣＲ７およびＣＤ６２Ｌを共発現する細胞の出現率において、Ｄｙｎａｂｅａｄで拡大またはＡＰＣ－ＭＳで拡大したＴ細胞生成物の間で有意差は観察されなかった（図３３）。これらホーミング分子は、よりナイーブなＴ細胞表現型を示し、インビボ移入後の機能にとって重要であることが示されている（Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，　Ｌ．ら　Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　１１５，　１６１６－１６２６（２００５））。全体として、これらのデータは、ＡＰＣ－ＭＳが、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳより迅速にマウスおよびヒトＴ細胞をポリクローナル拡大できたことを示す。

【０４２０】

初代マウスＴ細胞の抗原特異的拡大

ＯＴ－Ｉマウス（これは、Ｈ－２Ｋ（ｂ） ＭＨＣクラスＩの状況においてニワトリオボアルブミンに由来するＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）ペプチドに対して特異的なＴＣＲを発現する）から単離された初代マウスＣＤ８＋ Ｔ細胞を使用して、ＡＰＣ－ＭＳが抗原特異的拡大に適合され得るか否かを決定した。これらの細胞を、無関係のペプチドを負荷したＭＨＣ（ｐＭＨＣ）を提示するＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した場合に、最小限の細胞－材料相互作用を観察した。しかし、その細胞を、ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）を提示するＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した場合には、広範囲の細胞－材料クラスターの形成を生じる強い相互作用が観察された（図３４Ａ）。ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）を提示するＡＰＣ－ＭＳ製剤は、表面キューが脂質のうちの０．０１モル％程度の低さで提示されているとしても、ＯＴ－Ｉ ＣＤ８＋ Ｔ細胞の強い拡大を促進した（図３４Ｂ）。Ｂ１６－Ｆ１０黒色腫細胞に由来するＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）提示に応じて、その拡大されたＴ細胞は、ＩＦＮｙを分泌し（図３４Ｅ）、ＩＦＮｙおよびＴＮＦａの共発現をアップレギュレートし（図３４Ｃ）、標的細胞をインビトロで殺滅した（図３４Ｄ）。

【０４２１】

初代ヒトＴ細胞の抗原特異的拡大

ＡＰＣ－ＭＳが、希なヒトＴ細胞部分集団の抗原特異的富化および拡大に使用され得るか否かを決定した（これは、腫瘍または血液に由来する希ながん抗原特異的Ｔ細胞の選択的拡大に有用であり得る（Ｃｏｈｅｎ， Ｃ．Ｊ．ら Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ １２５， ３９８１－３９９１（２０１５）；およびＳｔｒｅｉｎｅｎ， Ｅ．ら Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５２， １３３７－１３４１（２０１６））。ＡＰＣ－ＭＳ製剤は、ＭＨＣクラスＩのＨＬＡ－Ａ２アロタイプの状況で、異なるＥＢＶ関連タンパク質に由来する２種のペプチド（ＣＬＧまたはＧＬＣいずれかで略称される）のうちの１種を提示した。ＣＤ８＋ Ｔ細胞を、以前にＥＢＶ曝露があったＨＬＡ－Ａ２マッチしたドナーのヒト血液サンプルから単離し、可溶性ＩＬ－２（３０ Ｕ／ｍｌ）単独（モック）で処理するか、またはＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳとともに培養するかのいずれかを行った。その２種のＴ細胞部分セットの強い抗原特異的富化および拡大が観察された一方で、全Ｔ細胞における最小限の増大が特に言及された（図３５Ａ）。ＣＬＧ特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞の出現率は、ＣＬＧ提示ＡＰＣ－ＭＳとともに培養した場合に、０日目での全ＣＤ８＋ Ｔ細胞のうちの０．０４％から、１４日目でのＣＤ８＋ Ｔ細胞のうちの３．３±０．９％へと増大し（図３６Ａおよび３６Ｂ）、これは、細胞数において１７０±７０倍の拡大に相当した（図３６Ｃ）。同様に、ＧＬＣ特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞の出現率は、ＧＬＣ提示ＡＰＣ－ＭＳとともに培養した場合に、０日目での全ＣＤ８＋ Ｔ細胞のうちの０．６６％から、１４日目での４８±９％へと増大し（図３６Ｄおよび３６Ｅ）、これは、細胞数において３００±１００倍の拡大に相当した（図３６Ｆ）。種々のＴ細胞生成物の機能性を、ＩＦＮｙ分泌（図３５Ｂ）、ＩＦＮγおよびＴＮＦαの共発現（図３５Ｃ、ならびに図３６Ｇ、３６Ｈ、および３６Ｉ）、ならびにペプチド負荷標的細胞のインビトロでの殺滅（図３６Ｊ）を評価することによって、Ｔ２刺激細胞（ｓｔｉｍｕｌａｔｏｒ ｃｅｌｌ）との共培養実験において分析した。ＣＬＧまたはＧＬＣのいずれかを提示するＡＰＣ－ＭＳで拡大したＣＤ８＋ Ｔ細胞集団は、それらのコグネート抗原を提示した刺激細胞に強く応答した。顕著なことには、Ｔ２細胞との共培養後に、テトラマー染色を介して検出したＣＬＧ特異的およびＧＬＣ特異的細胞の出現率は、ＩＦＮｙおよびＴＮＦａを共発現する細胞の出現率に類似しており、これは、その拡大されたＴ細胞のうちの大部分が機能的であることを示した。

【０４２２】

抗原特異的Ｔ細胞が、Ｔ細胞単離の必要性を事前に回避して、不均質な細胞集団（例えば、ＰＢＭＣ）から直接拡大され得るか否かを決定するために、以下の実験を行った。以前にＥＢＶ曝露があったＢＬＡ－Ａ２マッチさせたドナーのＰＢＭＣサンプルを、ＧＬＣ

提示ＡＰＣ－ＭＳ製剤とともに培養した。顕著なことには、ＧＬＣ特異的Ｔ細胞の出現率は、０日目での全ＣＤ８＋　Ｔ細胞のうちの０．６６％から、７日目での１５±１％へと増大した；モック処理サンプルにおいては最小限の変化が見出された（図３６Ｋ）。これは、ＧＬＣ特異的Ｔ細胞の６０±９倍の拡大に相当する（図３６Ｌ）。その拡大されたＴ細胞の機能性を、適用しないか、またはＣＬＧもしくはＧＬＣペプチドを適用するかのいずれかであったＴ２細胞との共培養によって評価した。ＴＮＦａおよびＩＦＮｙを共発現する細胞の出現率（図３６Ｍ）および１ＦＮ１分泌（図３６Ｎ）の定量は、ＰＢＭＣからＧＬＣ提示ＡＰＣ－ＭＳで拡大したＣＤ８＋　Ｔ細胞集団が、それらのコグネート抗原を提示したＴ２細胞にのみ強く応答することを示した。まとめると、これらのデータは、ＡＰＣ－ＭＳが抗原特異的様式においてマウスおよびヒトＴ細胞の両方を強く拡大する能力を示す。

【０４２３】

ＡＰＣ－ＭＳを使用して観察される、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを超える改善が、提示される抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体の量における差異にのみ原因があるわけではないか否かを決定するために、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳにおける抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体の量を、ＡＰＣ－ＭＳにおけるこれら抗体の濃度に相当するように正規化した。図４０Ｂ、４０Ｃおよび４０Ｄに示されるように、ＡＰＣ－ＭＳおよびＤＹＮＡＢＥＡＤに存在する抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体の量が匹敵する場合、ＡＰＣ－ＭＳは、消耗マーカーＰＤ－１およびＬＡＧ－３の匹敵する共発現レベルを維持しながら（図４０Ｃ）、初代マウスＴ細胞のより迅速な拡大を促進した（図４０Ｂ）。また、ＡＰＣ－ＭＳ製剤を調整することによって、ＣＤ４：ＣＤ８比は調整され得る（図４０Ｄ）。

【０４２４】

ＩＬ－２は、持続様式において、およそ１週間の過程にわたってＡＰＣ－ＭＳから放出されることが観察された。ＩＬ－２用量の効果およびＡＰＣ－ＭＳからの徐放を評価するために、初代マウスＴ細胞を、同じ量の抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体を提示するＤＹＮＡＢＥＡＤまたはＡＰＣ－ＭＳのいずれかとともに、７日間培養した。ＡＰＣ－ＭＳ条件に関しては、ＩＬ－２をＡＰＣ－ＭＳ上に負荷し、経時的に放出させる（Ｍ－Ｄ）か、または同じ用量のＩＬ－２を可溶性ボーラスとしてｄ０に培地の中に添加する（Ｍ－Ｄ／ｂＩＬ－２）のいずれかであった。ＤＹＮＡＢＥＡＤ条件に関しては、ＩＬ－２を製造業者の推奨する量で培地の中に補充し、各培地交換時に補給する（ｒｅｆｒｅｓｈ）（Ｄ－Ｂ）か、または可溶性ボーラスとしてｄ０に培地の中にＡＰＣ－ＭＳへと負荷したその同じ用量で添加する（Ｄ－Ｂ／ｂＩＬ－２）かのいずれかであった。図４１Ａに示されるように、ＡＰＣ－ＭＳは、ＩＬ－２をＡＰＣ－ＭＳに負荷し、経時的に放出させた場合に、ＩＬ－２のその同じ用量を培地の中に可溶性ボーラスとして添加した場合よりも大きく初代マウスＴ細胞の拡大を促進した。このことは、この状況においてＩＬ－２を提示する利益を示す。ＡＰＣ－ＭＳは、提示される抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８およびＩＬ－２の量が匹敵する場合（Ｍ－Ｄ／ｂＩＬ－２　対　Ｄ－Ｂ／ｅＩＬ－２）に、ＤＹＮＡＢＥＡＤより大きく初代マウスＴ細胞の拡大を促進した。このことは、ＡＰＣ－ＭＳの状況においてこれらのキューを提示する利益を示す。図４１Ｂに示されるように、提示される抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８およびＩＬ－２の量が匹敵する場合、ＡＰＣ－ＭＳで拡大されたＴ細胞は、ＤＹＮＡＢＥＡＤで拡大されたものより低い消耗マーカーＰＤ－１およびＬＡＧ－３の共発現を示した（Ｍ－Ｄ／ｂＩＬ－２　対　Ｄ－Ｂ／ｂＩＬ－２）。

【０４２５】

上記の実験は、ＡＰＣ－ＭＳが多機能性の材料であり、流体脂質二重層の表面上で局所的にＴＣＲ刺激および共刺激キューを提示し得、そして近くのＴ細胞への可溶性サイトカインの持続した傍分泌送達を促進し得ることを示す。ａＣＤ３またはｐＭＨＣ、ａＣＤ２８、およびＩＬ－２を提示する３成分の製剤は、市販のＤＹＮＡＢＥＡＤＳより有意に速いポリクローナル拡大を含め、初代マウスおよびヒトＴ細胞の迅速なポリクローナルおよび抗原特異的拡大を促進した。重要なことには、増大した拡大速度が、この実施例において使用したＡＰＣ－ＭＳで観察されるにも拘わらず、拡大されたＴ細胞は、機能的表現型

を保持できた。このことは、拡大速度が基本的に、機能に逆に関連するわけではないことを示す。Ｔ細胞は、ＡＰＣ－ＭＳが関連するＴＣＲキューを提示するように製剤化されなければ、ＡＰＣ－ＭＳを概して無視した。このことは、複雑な細胞混合物（例えば、ＰＢＭＣ）からですら、Ｔ細胞の希な部分集団の特定の拡大を可能にした。

【０４２６】

これらの研究の結果は、これらのキューが天然に提示される方法に匹敵する様式で、Ｔ細胞に表面および可溶性キューの両方を提示する重要性を裏付ける。合成ａＡＰＣに関する以前の研究は、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２）をＴ細胞へと傍分泌様式で送達することがサイトカインの効果を強化し得ることを示した（Ｓｔｅｅｎｂｌｏｃｋ ａｎｄ Ｆａｈｍｙ（２００８）；およびＦａｄｅｌら（２０１４））。現在のシステムは、ＴＣＲクラスター化を促進するために、刺激の静的な高密度提示を通じてＴ細胞活性化を強化することに主に焦点を当てる（Ｚａｐｐａｓｏｄｉら（２００８）； Ｆａｄｅｌら（２０１４）；およびＦａｄｅｌら（２００８））。しかし、ＴＣＲのクラスター化は、Ｔ細胞活性化を増強するのみならず、Ｔ細胞過剰刺激から防御するためにＴＣＲシグナル伝達の持続時間を制限するようにも働く、時間を経て多くの細胞表面分子の再組織化を要する動的プロセスにおける１工程に過ぎない（Ｈｕｐｐａ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（２００３）； Ｌｅｅら（２００３）； Ａｌａｒｃｏｎら（２０１１））。流体脂質二重層の表面にわたってＴ細胞キューを提示する場合に、これらのキューがＡＰＣ形質膜の表面上で天然に遭遇される方法をまねると、比較的低い表面キュー密度は、より迅速な拡大速度およびより機能的かつより消耗の低い表現型を有するＴ細胞の生成を促進することが観察された。

【０４２７】

非常に高いアスペクト比の粒子を使用して、ＡＰＣ－ＭＳを形成したところ、これは、大部分の以前に記載された合成ａＡＰＣ材料とは対照的である（Ｓｔｅｅｎｂｌｏｃｋ ａｎｄ Ｆａｈｍｙ（２００８）； Ｆａｄｅｌら（２０１４）； Ｓｕｎｓｈｉｎｅら（２０１４）； Ｆａｄｅｌら（２００８）； Ｍｅｙｅｒら（２０１５）；およびＳｔｅｅｎｂｌｏｃｋ（２０１１））。これらの粒子は、自発的に沈殿および積み重なって、高表面積の３Ｄ構造を形成し、Ｔ細胞が浸潤するこの構造はリモデルされて、密な細胞－材料クラスターを形成し、Ｔ細胞がその材料に直ぐ近接している微小環境を作り出した。これはおそらく、ＩＬ－２のより効率的な傍分泌送達、および増大したＴ細胞－Ｔ細胞傍分泌シグナル伝達を可能にする（Ｌｏｎｇ， Ｍ． ＆ Ａｄｌｅｒ， Ａ．Ｊ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １７７， ４２５７－４２６１（２００６））。そのロッドの比較的大きなサイズおよび高アスペクト比はおそらく、Ｄｙｎａｂｅａｄ培養物に対して、ＡＰＣ－ＭＳにおいて観察されたより大きなクラスターの形成に寄与した。なぜならより多くのＴ細胞が、より小さい球状のＤＹＮＡＢＥＡＤＳとより、各ロッドと相互作用できたからである。ＡＰＣ－ＭＳ培養物におけるこれらクラスターの持続性は、表面キュー密度および培養物中の材料の量に依存し、これはおそらく、種々のＡＰＣ－ＭＳ条件において観察された異なる表現型に寄与した。

【０４２８】

ポリクローナルマウスＴ細胞拡大研究において、ＡＰＣ－ＭＳは、Ｔ細胞集団の極端にＣＤ８に偏った非対称性を促進した。これは、ＩＬ－２の傍分泌送達がマウスＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を増強したが、マウスＣＤ４＋ Ｔ細胞において活性化誘導性細胞死を促進したという以前の観察と一致する（Ｓｔｅｅｎｂｌｏｃｋら（２０１１））。しかし、ポリクローナルヒトＴ細胞拡大研究において、非対称性は、極めてＣＤ４に偏った非対称性を促進するＴ細胞刺激のより高い量を含む条件とともに、ＡＰＣ－ＭＳによって提示されたＴ細胞刺激の全体的な量に依存した。この矛盾は、マウスおよびヒトＴ細胞がこれらのキューに応答する方法における基本的な差異を示し得る。この挙動をよりよく理解することは、養子的に移入されるＴ細胞の機能にとって重要であることが近年示された特性である、混合のＴ細胞集団を特定のＣＤ４：ＣＤ８比に向かって偏らせる材料製剤を可能にし得る（Ｔｕｒｔｌｅ， Ｃ．Ｊ．ら Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ

Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ １２６（２０１６））。

【０４２９】

機能的Ｔ細胞の治療上関連する数をエキソビボで迅速に生成する必要性は、個別化されたＴ細胞療法においてかなりの難題であり、この研究の結果は、ＡＰＣ－ＭＳがこの必要性を満たすことに向かってかなりの前進をもたらすことを示す（Ｔｕｒｔｌｅ，Ｃ．Ｊ．＆Ｒｉｄｄｅｌｌ，Ｓ．Ｒ．Ｃａｎｃｅｒ Ｊｏｕｒｎａｌ（Ｓｕｄｂｕｒｙ，Ｍａｓｓ．） １６，３７４（２０１０）；およびＥｇｇｅｒｍｏｎｔ，Ｌ．Ｊ．ら Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２，４５６－４６５（２０１４））。３成分のＡＰＣ－ＭＳ製剤での単一の刺激は、市販のＤＹＮＡＢＥＡＤＳより有意に速いＴ細胞拡大を促進することが観察され、その材料のパラメーターが、迅速な拡大速度を損なうことなく、細胞生成物の表現型を改善するように操作され得ることを示した。ＡＰＣ－ＭＳは分子プラットフォーム技術であることから、そのシステムの構成要素は、キューが提示される空間的および時間的状況を改変するように変更または変化され得る。例えば、ＭＳＲ特性を変更することは、足場微小環境または分解動態の調整を可能にし得る。脂質製剤を変化させることは、ＳＬＢ安定性、流動性、もしくは表面キュー分配の調整、または異なる化学現象を介するキューの付着を可能にし得る（Ｔｏｒｒｅｓら（２０１３）；Ｐｕｕ，Ｇ．＆Ｇｕｓｔａｆｓｏｎ，Ｉ．Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ（ＢＢＡ）－Ｂｉｏｍｅｍｂｒａｎｅｓ １３２７，１４９－１６１（１９９７）；Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｎ．Ａ．ら Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １２９，２０９４－２１００（２００７）；Ｃｏｌｌｉｎｓ，Ｍ．Ｄ．＆Ｋｅｌｌｅｒ，Ｓ．Ｌ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １０５，１２４－１２８（２００８）；Ｒｅｉｃｈ，Ｃ．ら Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ９５，６５７－６６８（２００８）；Ｌｏｎｇｏ，Ｇ．Ｓ．ら Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ９６，３９７７－３９８６（２００９）；Ｋｗｏｎｇ，Ｂ．ら Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ３２，５１３４－５１４７（２０１１）；Ｋｏｏ，Ｈ．ら Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ ５１，１１８３６－１１８４０（２０１２）；およびＤｅｓａｉ，Ｒ．Ｍ．ら Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ５０，３０－３７（２０１５））。本明細書で記載されるＡＰＣ－ＭＳはまた、表面および可溶性キューの両方のより大きなセットを提示するように変更されうる。これは、ＡＣＴＳのためにさらに最適化されたＴ細胞の生成を可能にし得る（Ｈａｓａｎら（２０１５）；およびＨｅｎｄｒｉｋｓら（２０００））。

【０４３０】

方法

細胞および試薬

Ｂ１６－Ｆ１０マウス黒色腫細胞株をＡＴＣＣから得、マイコプラズマが陰性であることを確認した。Ｂ１６－Ｆ１０細胞を、１０％ 熱非働化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（ＨＩ－ＦＢＳ）および１％ ペニシリン－ストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で培養した。Ｂ３Ｚマウス Ｔ細胞ハイブリドーマ細胞を、１０％ ＨＩ－ＦＢＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、５０μＭ β－メルカプトエタノール、および１％ ペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ １６４０中で培養した。Ｔ２（１７４ ｘ ＣＥＭ．Ｔ２） ヒトリンパ芽球細胞を、１０％ ＨＩ－ＦＢＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、５０μＭ β－メルカプトエタノール、０．１ｍＭ 非必須アミノ酸、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、および１％ ペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ １６４０中で培養した。初代マウスおよびヒトＴ細胞を、１０％ ＨＩ－ＦＢＳ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、５０μＭ β－メルカプトエタノール、０．１ｍＭ 非必須アミノ酸、１ｍＭ ピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、および１％ ペニシリン－ストレプトマイシンを補充し、それ

ぞれ、３０　Ｕ／ｍｌ　組換えマウスまたはヒトＩＬ－２を補充したＲＰＭＩ　１６４０中で培養した。

【０４３１】

ＭＳＲ合成のための全化学試薬を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。全ての脂質を、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓから購入した。これらの研究において使用される特定の脂質は、以下のとおりである：　ＤＯＰＣ（８５０３７５Ｃ）、ＰＯＰＣ（８５０４５７Ｃ）、ＤＰＳＣ（８５０３６５Ｃ）、ＰＥ－ｃａｐ－ビオチン（８７０２７３Ｃ）、１８：１　ＰＥ－カルボキシフルオレセイン（８１０３３２Ｃ）。ＦｏｘＰ３抗体を、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入した。全ての他の抗体を、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄから購入した。マウスおよびヒト組換えＩＬ－２を、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄから購入した。ビオチン化ペプチド負荷ＭＨＣモノマーおよび発蛍光団標識テトラマーを、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｔｅｔｒａｍｅｒ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙから購入した。マウスおよびヒトＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔ細胞拡大ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。オボアルブミン由来ペプチドＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）を、Ａｎａｓｐｅｃから購入した。ＥＢＶ由来ペプチドＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）およびＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）を、Ｐｒｏｉｍｍｕｎｅから購入した。

【０４３２】

メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）の合成

ＭＳＲを、先に報告されるように合成した（Ｋｉｍら（２０１５）；およびＬｉら（２０１６））。簡潔には、４ｇのＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｐ１２３界面活性剤（平均Ｍｎ　約５，８００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を、１５０ｇの１．６Ｍ　ＨＣｌ溶液に溶解し、８．６ｇのオルトケイ酸テトラエチル（ＴＥＯＳ，　９８％，　Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）とともに４０℃において２０時間撹拌し、続いて、１００℃において２４時間撹拌した。その後、界面活性剤を、１％　ＨＣｌ／エタノール（ｖ／ｖ）中、７０℃において２０時間抽出することによって、調製されたままの粒子から除去した。懸濁物を、０．２２μｍフィルタを通すことによって粒子を回収し、エタノールで洗浄し、乾燥させた。

【０４３３】

初代マウスＴ細胞単離

動物に関わる全ての手順を、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌのガイドラインに準拠して行った。動物を、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入した。ポリクローナルＴ細胞拡大研究に関しては、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを細胞ドナーとして使用した。抗原特異的Ｔ細胞拡大研究に関しては、Ｃ５７ＢＬ／６－Ｔｇ（ＴｃｒａＴｃｒｂ）１１００Ｍｊｂ／Ｊ（ＯＴ－Ｉ）マウスを細胞ドナーとして使用した。全ての動物は雌性であり、実験の開始時に６～９週齢の間で使用した。Ｔ細胞を単離するために、脾細胞を、７０μｍナイロンセルストレーナーを通して脾臓を潰すことによって調製し、赤血球をＡＣＫ緩衝液中に溶解した。その後、ＣＤ３＋　Ｔ細胞を、汎Ｔ細胞単離ＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用してポリクローナルＴ細胞拡大研究のために単離するか、またはＣＤ８＋　Ｔ細胞を、ＣＤ８ａ＋　Ｔ細胞単離ＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して抗原特異的Ｔ細胞拡大研究のために単離するかのいずれかを行った。

【０４３４】

初代ヒトＴ細胞単離

匿名化した白血球低減カラー（ｌｅｕｋｏｒｅｄｕｃｔｉｏｎ　ｃｏｌｌａｒ）を、Ｂｒｉｇｈａｍ　ａｎｄ　Ｗｏｍｅｎ’ｓ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ　Ｓｐｅｃｉｍｅｎ　Ｂａｎｋから得た。ＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌ勾配で白血球低減物（ｌｅｕｋｏｒｅｄｕｃｔｉｏｎ）から単離し、続いて、２回洗浄して、血小板夾雑物を除去した。その後、いくつかの研究では、ＣＤ３＋　Ｔ細胞を、汎Ｔ細胞単離ＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用してポリクローナルＴ細胞拡大研究のために単離するか、またはＣＤ

８＋　Ｔ細胞を、ＣＤ８＋　Ｔ細胞単離ＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して抗原特異的Ｔ細胞拡大研究のために単離するかのいずれかを行った。

【０４３５】

抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）の調製

ＭＳＲおよびリポソームを、ＡＰＣ－ＭＳアセンブリの前に調製した。リポソームを調製するために、所定の脂質製剤から構成される脂質フィルムを、脂質－クロロホルム懸濁物を混合し、大半のクロロホルムを窒素下でエバポレートし、そして残留クロロホルムを一晩真空チャンバの中で除去することによって先ず調製した。全ての機能研究のために、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）を、主な脂質として使用し、脂質製剤を、０．０１～１モル％の間の、カルボキシフルオレセインタグ化脂質１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（カルボキシフルオレセイン）、またはビオチン化脂質１，２－ジ－（９Ｚ－オクタデセノイル）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－（キャップビオチニル）のいずれかでドープした。いくつかの特徴づけ研究のために、脂質、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）および１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）を、主な脂質として代わりに使用した。脂質フィルムを、２．５ｍｇ／ｍｌ　脂質でＰＢＳ中に再懸濁し、１時間にわたって１０分ごとにボルテックスルすることによって再水和した。その後、脂質懸濁物を、Ｍｉｎｉ－Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）を使用して１００ｎｍ　ポリカーボネートフィルタを通して押し出して、単分散リポソーム懸濁物を得た。リポソーム懸濁物を、４℃で貯蔵し、１週間以内に使用した。ＡＰＣ－ＭＳ製剤を調製するために、ＭＳＲ（１０ｍｇ／ｍｌ）を、ＰＢＳ中の組換えＩＬ－２（０．０４ｍｇ／ｍｌ）とともに１時間室温においてインキュベートした。ＭＳＲ－ＳＬＢを形成するために、リポソームを、脂質：ＭＳＲ　１：４（ｗ／ｗ）で添加し、１時間、室温において１０分ごとにピペッティングしながらインキュベートした。次に、その物質を、ＰＢＳで２回洗浄し、次いで、ＰＢＳ中の０．２５％　ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（ｗ／ｖ）中、その材料を２．５ｍｇ／ｍｌ（ＭＳＲに関して）で再懸濁することによって、１５分間遮断した。その後、ストレプトアビジンを、特定の製剤（ＰＯＰＣに対して３４％　脂質保持と想定）中のビオチン化脂質の量の３０％　理論的飽和に相当するモル量において添加し（１％　ビオチン化脂質製剤に関して５００μｇ　ＭＳＲあたり２５μｇ　ストレプトアビジン）、その懸濁物を、２０分間にわたり５分ごとにピペッティングすることによって混合した。次に、ビオチン化Ｔ細胞活性化キュー（１：１　モル比　ＴＣＲ活性化キュー：αＣＤ２８）を、その添加されたストレプトアビジンの８０％モル飽和に相当する量で添加し、その懸濁物を、１時間にわたって１０分ごとにピペッティングすることによって混合した。最後に、その材料をＰＢＳで２回洗浄し、インビトロアッセイのために細胞培養培地中に再懸濁した。ＡＰＣ－ＭＳ製剤は、Ｔ細胞拡大実験のために直ぐ使用するか、または４℃で貯蔵し、特徴づけ研究のために１週間以内に使用するかのいずれかであった。

【０４３６】

ＭＳＲ－支持脂質二重層（ＭＳＲ－ＳＬＢ）構造および安定性の特徴づけ

明視野および蛍光顕微鏡法を、ＭＳＲ脂質被覆、ＭＳＲ－ＳＬＢ分散性、およびＭＳＲ－ＳＬＢ分解を評価するために使用し、ＥＶＯＳ　ＦＬ　Ｃｅｌｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを用いて行った。共焦点顕微鏡法を、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７１０共焦点システムを使用して行った。ＭＳＲでの脂質保持を評価するために、ＭＳＲを、１モル％　発蛍光団タグ化脂質を含む脂質製剤で被覆し、その脂質保持を、プレートリーダーを使用して定量した。経時的なパーセント脂質保持を計算するために、培養した材料を、７００ｒｃｆで５分間遠心分離することによって、特定された時点で回収し、蛍光強度を、培養前の蛍光強度に対して正規化した。ＭＳＲ－ＳＬＢ流動性を評価するために、光退色後の蛍光回復（ＦＲＡＰ）実験を、１モル％　発蛍光団タグ化脂質を含む脂質製剤で被覆したＭＳＲに対して、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７１０共焦点システムを使用して行った。光退色を

、４８８ｎｍレーザー線で行い、少なくとも１５０秒間にわたって１０秒ごとに画像を撮った。蛍光回復を、異なるロッドに関して、各時点で、光退色した領域内の蛍光強度を退色していない領域における蛍光強度に対して正規化することによって、ＩｍａｇｅＪを使用して分析した。

【０４３７】

ＩＬ－２負荷および放出を定量するために、５００μｇのＭＳＲに２μｇのＩＬ－２を負荷し、次いで、記載されるとおりの脂質で被覆した。ＰＢＳで２回洗浄した後、ＩＬ－２負荷ＭＳＲ－ＳＬＢを、５００μｌ　放出緩衝液（ＰＢＳ中１％　ＢＳＡ（ｗ／ｖ））中に再懸濁し、細胞培養条件でインキュベートした。示された時点で、サンプルを遠心分離し（７００ｒｃｆで５分間）、その上清を集めた。その後、ＭＳＲを新鮮な放出緩衝液中に再懸濁し、培養物に戻した。上清サンプル中のＩＬ－２を、ＥＬＩＳＡ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を介して定量した。

【０４３８】

表面キュー負荷を定量するために、ＭＳＲ－ＳＬＢサンプルを、０．０１、０．１、または１モル％　ビオチン化脂質を含む脂質製剤を使用して調製した。ストレプトアビジンを、その保持されたビオチン化脂質（ＰＯＰＣに対して３５％　脂質保持と想定）の３０％　理論的飽和に相当する量において添加し、続いて、ビオチン化ＩｇＧを、その添加されたストレプトアビジンの４０％飽和または８０％飽和のいずれかに等しい量で添加した。コントロールとして、その同じ量のビオチン化ＩｇＧを含むが、材料を含まないサンプルもまた調製した。全てのサンプルを、７００ｒｃｆで５分間遠心分離して、その材料をペレットにし、その上清画分中のＩｇＧの量を、ＥＬＩＳＡ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を介して定量した。サンプルを調製するために使用されたビオチン化ＩｇＧストックをまた使用して、標準曲線を調製した。その材料上に負荷したＩｇＧの量を、コントロールサンプル上清中で検出されたＩｇＧの量を、それぞれの材料サンプル上清中で検出されたＩｇＧの量から差し引くことによって計算した。走査型電子顕微鏡法（ＳＥＭ）のために、細胞を、ガラス化バースリップ上のＡＰＣ－ＭＳとともに一晩培養し、４％　パラホルムアルデヒド中で固定し、次いで、２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。固定したサンプルを、水中の０％、３０％、５０％、７５％、９０％、１００％エタノールの勾配を通じて連続して移した。サンプルを、ヘキサメチルジシラザン（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中に沈め、ベンチトップデシケーター中で一晩維持した。乾燥したカバースリップをＳＥＭスタブ上にカーボンテープを使用して取り付け、５ｎｍの白金－パラジウムでスパッタコーティングし、Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｓｕｐｒａ　５５　ＶＰ電界放出型走査型電子顕微鏡での二次電子検出を使用して画像化した。

【０４３９】

インビトロでのＴ細胞拡大研究

ポリクローナルマウスおよびヒトＴ細胞拡大実験を、初代ＣＤ３＋　Ｔ細胞を使用して行った。抗原特異的マウスＴ細胞拡大実験を、ＯＴ－Ｉマウスから単離したＣＤ８＋　Ｔ細胞を使用して行った。抗原特異的ヒトＴ細胞拡大実験を、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、または匿名化したドナー血液サンプルから単離したＰＢＭＣＳのいずれかを使用して行った。単離された初代マウスもしくはヒトＴ細胞、またはヒトＰＢＭＣを、活性化刺激と混合し、２週間まで培養した。全ての実験において、非組織培養処理培養容器を使用した。ヒト抗原特異的Ｔ細胞拡大研究のために、培養物を確立する前に、ドナーサンプルを、ＦＡＣＳを介してＨＬＡ－Ａ２　ＭＥＷ　Ｉ発現に関して、および血清の抗ＥＢＶ　ＶＣＡ　ＥＬＩＳＡ（１ＢＬ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を介して以前のＥＢＶ曝露に関してアッセイした。ＨＬＡ－Ａ２＋　ＥＢＶを経験したサンプルのみを、拡大研究に使用した。

【０４４０】

ヒト抗原特異的Ｔ細胞拡大実験におけるモック処理サンプルを、３０　Ｕ／ｍｌ　組換えＩＬ－２を補充した培地中で培養した。全ての他のＴ細胞拡大実験におけるモック処理サンプルを、非補充培地中で培養した。市販のＤｙｎａｂｅａｄ条件に関しては、ＤＹＮＡＢＥＡＤＳを、キットともに含まれる製造業者が最適化したプロトコルに従って使用し

た。簡潔には、Ｔ細胞を、１×１０^{6}　Ｔ細胞／ｍｌの密度で予備洗浄したＤＹＮＡＢＥＡＤＳとともにビーズ－対－細胞比　１：１で、３０　Ｕ／ｍｌ　組換えＩＬ－２を補充した培地中に播種した。Ｄｙｎａｂｅａｄ培養物に関しては、１×１０^{5}　細胞を、出発培養において播種した。細胞を３日ごとに計数し、新鮮なＩＬ－２補充培地を、細胞懸濁物が０．５～１×１０^{6}　細胞／ｍｌの密度になるように添加した。一般に、細胞を、培養期間全体を通じて２．５×１０^{6}　細胞／ｍｌの密度未満に維持した。

【０４４１】

マウスポリクローナル研究に関しては、１：１モル比において０．２～１モル％の間の脂質上に表面キュー（αＣＤ３＋αＣＤ２８）を提示するＡＰＣ－ＭＳを調製し、３３３μｇ／ｍｌで出発培養物に添加した。ヒトポリクローナル研究に関しては、１：１モル比において０．１モル％または１モル％いずれかの脂質上に表面キュー（αＣＤ３＋αＣＤ２８）を提示するＡＰＣ－ＭＳを調製し、３３μｇ／ｍｌまたは３３３μｇ／ｍｌで出発培養物に添加した。マウス抗原特異的研究に関しては、１：１モル比において０．０１モル％または０．１モル％のいずれかの脂質上に表面キュー（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ（配列番号３）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）またはＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）／Ｈ－２Ｋ（ｂ）＋αＣＤ２８）を提示するＡＰＣ－ＭＳを調製し、３３μｇ／ｍｌまたは３３３μｇ／ｍｌで出発培養物に添加した。ヒト抗原特異的研究に関しては、１：１モル比において１モル％の脂質上に表面キュー（ＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）／ＨＬＡ－Ａ２またはＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２）／ＨＬＡ－Ａ２＋αＣＤ２８）を提示するＡＰＣ－ＭＳを調製し、３３３μｇ／ｍｌで出発培養物に添加した。１モル％の脂質上にキューを提示し、３３３μｇ／ｍｌにおいて添加されたＡＰＣ－ＭＳは、出発培養物において約５５ｎＭのＴＣＲ刺激およびαＣＤ２８に相当する。ＡＰＣ　ｍｓ条件に関しては、Ｔ細胞を、５×１０^{4}　細胞／ｍｌにおいて特定された量の材料とともにＩＬ－２を補充しなかった培地中に播種した。全てのＡＰＣ－ＭＳ条件において、２．５×１０^{4}　細胞を、出発培養物中に播種した。培地を、培養期間全体を通じて添加して、細胞を密度２．５×１０^{6}　細胞／ｍｌ未満に維持した。７日目に開始して、大部分の物質に負荷されたＩＬ－２が放出された場合に、添加した新鮮な培地に、３０　Ｕ／ｍｌ　組換えＩＬ－２を補充した。特定された時点において、生細胞を、トリパンブルー排除を使用して血球計算板を用いて手動で計数して、物質の夾雑の結果として、自動化計数システムに伴って考えられるアーチファクトを回避した。計数後、フローサイトメトリーを使用して細胞表現型を評価した。ゲートを、蛍光マイナス１（ＦＭＯ）コントロールに基づいて独立して設定した各時点およびサンプルについて設定した。

【０４４２】

インビトロでのＴ細胞機能研究

ＩＦＮγおよびＴＮＦαのＴ細胞発現を細胞内サイトカイン染色を介して評価した共培養実験に関して、刺激細胞（マウス、Ｂ１６－Ｆ１０；ヒト、Ｔ２）を、１μｇ／ｍｌペプチド（マウス、ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）；ヒト、ＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）またはＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２））を３０分間３７℃において適用しないかまたは適用するかのいずれかを先ず行った。その後、１×１０^{5}の拡大された細胞を、２×１０^{4}　刺激細胞とともに、ブレフェルジンＡ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を添加する前に１時間培養して、サイトカイン分泌を阻害し、次いで、さら４時間培養した。次いで、細胞を染色し、ＦＡＣＳを使用して分析した。

【０４４３】

インビトロ殺滅アッセイを、標的細胞（マウス、Ｂ１６－Ｆ１０；ヒト、Ｔ２）を２０μｇ／ｍｌ　Ｃａｌｃｅｉｎ　ＡＭ（Ｂｉｏｔｉｕｍ）中で３０分間、３７℃において先ずインキュベートすることによって行った。その後、標的細胞は、１μｇ／ｍｌ　ペプチド（マウス、ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号４）；ヒト、ＣＬＧＧＬＬＴＭＶ（配列番号１）またはＧＬＣＴＬＶＡＭＬ（配列番号２））を３０分間、３７℃において適用しないかまたは適用するかのいずれかであった。次いで、５×１０^{3}　標的細胞を、拡大されたエフェクター細胞とともに、エフェクター細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）比　０、１、１０、２

５、または５０において４時間培養した。次いで、細胞をペレットにし、上清サンプルの蛍光強度を、プレートリーダーを使用して定量した。上清サンプル中のＩＦＮγ濃度をまた、ＥＬＩＳＡ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を介して定量した。

【０４４４】

統計分析

全ての値を、別段特定されなければ、平均±ｓ．ｄ．として表した。統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して行った。統計方法を本文中に述べる。全ての場合に、ｐ＜０．０５を有意と見做した。

【０４４５】

実施例１２：インビトロでのＡＰＣ－ＭＳの分解の分析

例示的ＡＰＣ－ＭＳのインビトロでの分解を研究するために、以下の実験を行った。αＣＤ３／αＣＤ２８抗体（１％　ビオチン化脂質）を含み、ＩＬ－２を放出するＡＰＣ－ｍｓ（１６７μｇ）を、初代マウスＴ細胞（２５ｅ^{4}　Ｔ細胞／１６７μｇ　ＭＳＲ）とともに培養した。種々の時点において、培養物を７００ｒｃｆで５分間遠心分離し、ペレット中のシリカ（Ｓｉ）含有量を、誘導結合プラズマ発光分光分析（ＩＣＰ－ＯＥＳ；Ｇａｌｂｒａｉｔｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を介して定量した。図３７に示されるように、シリカは、約１週間後に培養物ペレット中で検出不能であった。

【０４４６】

実施例１３：ＡＰＣ－ＭＳからの多様な溶解性免疫指向性ペイロードの放出制御

例示的ＡＰＣ－ＭＳからのサイトカインペイロードの放出を研究するために、以下の実験を行った。２μｇのＩＬ－２、ＩＬ－２１、ＴＧＦβまたはＩＬ－１５ＳＡいずれかを各々含む４種のＡＰＣ－ＭＳを、脂質被覆の前に、５００μｇ　メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）に負荷した。サンプルを徹底的に洗浄して、いかなる負荷されていないタンパク質をも除去し、その後、３７℃において２８日間まで維持した。経時的なペイロード放出を、ＥＬＩＳＡを使用して評価した。図３８に示されるように、ＡＰＣ－ＭＳからのサイトカインの放出制御が、実験の過程にわたって得られた。放出動態はおそらく、特定のサイトカインの物理化学的特性に依存する。

【０４４７】

実施例１４：クリックケミストリー反応を介するＭＳＲ－ＳＬＢへの抗体の結合体化

機能的分子がＭＳＲ－ＳＬＢ脂質二重層に結合体化され得るか否かを決定するために、以下の実験を行った。ＩｇＧを、Ｔｈｅｒｍｏ　ＳｉｔｅＣｌｉｃｋ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して、アジド基で部位特異的に標識した。種々の量の（モル％）のＤＢＣＯ改変脂質（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ）を含むＭＳＲ－ＳＬＢもまた、調製した。図４２Ａおよび４２Ｂに示されるように、アジド改変ＩｇＧは、濃度依存性様式で、ＭＳＲ－ＳＬＢの脂質二重層上に成功裡に結合体化された。

【０４４８】

均等論

当業者は、慣用的実験法のみを使用して、本明細書で記載される具体的な実施形態および方法に対する多くの均等物を認識するかまたは確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）であって、該足場は、

高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層；

該ＭＳＲ基部層上に層化された連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）；

該足場に吸着された、複数のＴ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子；ならびに

該足場上に吸着された複数のＴ細胞ホメオスタシス因子、

を含む足場。

（項目２）

前記Ｔ細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１に記載の足場。
（項目３）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、前記ＳＬＢ層上に吸着される、項目１に記載の足場。
（項目４）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、前記ＭＳＲ基部層上に吸着される、項目１に記載の足場。
（項目５）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、放出制御様式において前記足場から放出される、項目１に記載の足場。
（項目６）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、少なくとも３０日間にわたって持続様式において前記足場から放出される、項目１に記載の足場。
（項目７）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－２１、およびトランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）、またはこれらのアゴニスト、これらの模倣物、これらの改変体、その機能的フラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１に記載の足場。
（項目８）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、ＩＬ－２、そのアゴニスト、その模倣物、その改変体、その機能的フラグメント、またはこれらのＩＬ－７、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５、およびＩＬ－１５スーパーアゴニストからなる群より選択される第２のホメオスタシス因子との組み合わせである、項目７に記載の足場。
（項目９）
前記Ｔ細胞ホメオスタシス因子は、ＩＬ－２の最初の３０アミノ酸（ｐ１－３０）を含むＮ末端ＩＬ－２フラグメント、ＩＬ－２スーパーカインペプチド、およびＩＬ－２部分アゴニストペプチド、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目７に記載の足場。
（項目１０）
前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、前記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）上に吸着される、項目１に記載の足場。
（項目１１）
前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子は、親和性対形成または化学的カップリングを介して吸着される、項目１０に記載の足場。
（項目１２）
前記親和性のカップリングは、ビオチン－ストレプトアビジンの対、抗体－抗原の対、抗体－ハプテンの対、親和性の対、捕捉タンパク質の対、Ｆｃレセプター－ＩｇＧの対、金属－キレート化脂質の対、またはこれらの組み合わせを含む、項目１１に記載の足場。
（項目１３）
前記化学的カップリングは、アジド－アルキン化学（ＡＡＣ）反応、ジベンゾ－シクロオクチン連結（ＤＣＬ）、またはテトラジン－アルケン連結（ＴＡＬ）を含む、項目１１に記載の足場。
（項目１４）
前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、前記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）上に被覆される、項目１０に記載の足場。
（項目１５）
前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、前記流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）に部分的に埋め込まれる、項目１０に記載の足場。

（項目１６）
前記Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子は、各々、独立して、前記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）上に吸着される、項目１に記載の足場。
（項目１７）
前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子は、各々、独立して、抗体分子またはその抗原結合フラグメントである、項目１に記載の足場。
（項目１８）
前記Ｔ細胞活性化分子は、抗ＣＤ３抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗マクロファージスカベンジャーレセプター（ＭＳＲ１）抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＣＤ２抗体もしくはその抗原結合フラグメント、抗ＣＤ４７抗体もしくはその抗原結合フラグメント、ＭＨＣペプチドを負荷した主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子もしくはそのマルチマー、およびＭＨＣ－免疫グロブリン（Ｉｇ）結合体もしくはそのマルチマー、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１に記載の足場。
（項目１９）
前記Ｔ細胞共刺激分子は、ＣＤ２８、４．１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ２７（ＴＮＦＲＳＦ７）、ＧＩＴＲ（ＣＤ３５７）、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＨＶＥＭ（ＣＤ２７０）、ＬＴβＲ（ＴＮＦＲＳＦ３）、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＣＤ２２６（ＤＮＡＭ１）、ＣＲＴＡＭ（ＣＤ３５５），ＴＩＭ１（ＨＡＶＣＲ１、ＫＩＭ１）、ＣＤ２（ＬＦＡ２、ＯＸ３４）、ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０、ＳＬＡＭＦ１）、２Ｂ４（ＣＤ２４４、ＳＬＡＭＦ４）、Ｌｙ１０８（ＮＴＢＡ、ＣＤ３５２、ＳＬＡＭＦ６）、ＣＤ８４（ＳＬＡＭＦ５）、Ｌｙ９（ＣＤ２２９、ＳＬＡＭＦ３）およびＣＲＡＣＣ（ＣＤ３１９、ＢＬＡＭＥ）からなる群より選択される共刺激抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントである、項目１に記載の足場。
（項目２０）
前記Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子は、二重特異的抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、項目１に記載の足場。
（項目２１）
前記Ｔ細胞活性化分子およびＴ細胞共刺激分子は、ＣＤ３／ＣＤ２８、ＣＤ３／ＩＣＯＳ、ＣＤ３／ＣＤ２７、およびＣＤ３／ＣＤ１３７、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される対を含む、項目１に記載の足場。
（項目２２）
前記足場は、Ｆｃ融合タンパク質に特異的に結合する免疫グロブリン分子をさらに含む、項目１に記載の足場。
（項目２３）
前記足場は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２１（ＣＣＬ－２１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド１９（ＣＣＬ－１９）、ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド１２（ＣＸＣＬ１２）、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、またはＦＭＳ様チロシンキナーゼ３（Ｆｌｔ－３）リガンドからなる群より選択される動員化合物をさらに含む、項目１に記載の足場。
（項目２４）
前記動員化合物は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を含む、項目２３に記載の足場。
（項目２５）
前記足場は、抗原をさらに含む、項目１に記載の足場。
（項目２６）
前記抗原は、腫瘍抗原を含む、項目２５に記載の足場。
（項目２７）
前記腫瘍抗原は、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＣＥＡ、チロシナーゼ、

ミッドカイン、ＢＡＧＥ、ＣＡＳＰ－８、β－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ＣＡ－１２５、ＣＤＫ－１、ＣＤＫ４、ＥＳＯ－１、ｇｐ７５、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ－１、ＭＵＣ－１、ＭＵＭ－１、ｐ５３、ＰＡＰ、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ｒａｓ、ｔｒｐ－１、ＨＥＲ－２、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＩＬ１３Ｒα、ＩＬ１３Ｒα２、ＡＩＭ－２、ＡＩＭ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｃ９ｏｒｆ　１１２、ＳＡＲＴ１、ＳＡＲＴ２、ＳＡＲＴ３、ＢＲＡＰ、ＲＴＮ４、ＧＬＥＡ２、ＴＮＫＳ２、ＫＩＡＡ０３７６、ＩＮＧ４、ＨＳＰＨ１、Ｃ１３ｏｒｆ２４、ＲＢＰＳＵＨ、Ｃ６ｏｒｆ１５３、ＮＫＴＲ、ＮＳＥＰ１、Ｕ２ＡＦ１Ｌ、ＣＹＮＬ２、ＴＰＲ、ＳＯＸ２、ＧＯＬＧＡ、ＢＭＩ１、ＣＯＸ－２、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＺＨ２、ＬＩＣＡＭ、Ｌｉｖｉｎ、Ｌｉｖｉｎβ、ＭＲＰ－３、ネスチン、ＯＬＩＧ２、ＡＲＴ１、ＡＲＴ４、Ｂ－サイクリン、Ｇｌｉ１、Ｃａｖ－１、カテプシンＢ、ＣＤ７４、Ｅ－カドヘリン、ＥｐｈＡ２／Ｅｃｋ、Ｆｒａ－１／Ｆｏｓｌ１、ＧＡＧＥ－１、ガングリオシド／ＧＤ２、ＧｎＴ－Ｖ、β１，６－Ｎ、Ｋｉ６７、Ｋｕ７０／８０、ＰＲＯＸ１、ＰＳＣＡ、ＳＯＸ１０、ＳＯＸ１１、サバイビン、ＵＰＡＲ、ＷＴ－１、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＩＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤ　Ａｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸関連抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、Ｔ細胞レセプター／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－Ｉ、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＲＣＡＳｌ、α－フェトプロテイン、ｐｌ２０ｃｔｎ、Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、脳型グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－Ｉ、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－Ｉ、ＣＴ－７、ｃｄｃ２７、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、ＰｌＡ、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐｌ５、ＧＭ２、ＧＤ２ガングリオシド、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、ｌｍｐ－１、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－Ｉ、ＵＬ１６結合タンパク質様転写物１（Ｍｕｌｔ１）、ＲＡＥ－１タンパク質、Ｈ６０、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、およびｃ－ｅｒｂＢ－２、患者特異的ネオアンチゲン、またはこれらの免疫原性ペプチド、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目２５に記載の足場。

（項目２８）

前記支持脂質二重層（ＳＬＢ）　対　前記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）の重量比は、約１０：１～約１：２０の間である、項目１に記載の足場。

（項目２９）

前記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）は、（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、パルミトイル－オレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）またはこれらの組み合わせからなる群より選択される脂質を含む、項目１に記載の足場。

（項目３０）

前記メソポーラスシリカマイクロロッド－脂質二重層（ＭＳＲ－ＳＬＢ）足場は、連続流体体系を少なくとも１４日間にわたって保持する、項目１に記載の足場。

（項目３１）

前記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）　対　前記Ｔ細胞活性化／共刺激分子の乾燥重量比は、１：１～５０：１の間である、項目１に記載の足場。

（項目３２）

複数の項目１の足場を含むデバイスであって、ここで該足場は、前記メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）へのＴ細胞の浸潤を選択的に可能にするように積み重ねられる、デバイス。

（項目３３）

前記Ｔ細胞活性化分子および／または共刺激分子は、Ｔ細胞のインサイチュ操作を可能にするために十分な濃度で前記足場上に存在する、項目３２に記載のデバイス。

（項目３４）
項目１に記載の足場および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。
（項目３５）
前記組成物は、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、または筋肉内投与のために製剤化される、項目３４に記載の薬学的組成物。
（項目３６）
項目１に記載の足場および該足場の中にクラスター化されたＴ細胞を含む、組成物。
（項目３７）
前記Ｔ細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＣＤ３＋　Ｔ細胞、ＣＤ４＋　Ｔ細胞、ＣＤ８＋　Ｔ細胞、および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目３６に記載の組成物。
（項目３８）
必要性のある被験体において疾患を処置するための方法であって、該方法は、
該被験体から得られたＴ細胞集団を含むサンプルと、項目１に記載の抗原提示細胞模倣足場（ＡＰＣ－ＭＳ）とを接触させる工程であって、それによって、該Ｔ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持する工程；
該Ｔ細胞の集団を必要に応じて拡大する工程；および
該活性化され、共刺激され、維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞を、該被験体へと投与するステップであって、それによって、該被験体において該疾患を処置する工程、
を包含する方法。
（項目３９）
前記方法は、前記投与する工程の前に、前記Ｔ細胞の集団を再刺激する工程をさらに包含する、項目３８に記載の方法。
（項目４０）
前記サンプルは、血液サンプル、骨髄サンプル、リンパ液サンプル、または脾臓サンプルである、項目３８に記載の方法。
（項目４１）
前記被験体は、ヒトである、項目３８に記載の方法。
（項目４２）
前記疾患は、がんであり、前記足場は、少なくとも１種の細胞傷害性Ｔ細胞特異的活性化分子および少なくとも１種の細胞傷害性Ｔ細胞特異的共刺激分子を含む、項目３８に記載の方法。
（項目４３）
前記がんは、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、食道がん、骨がん、精巣がん、子宮頸がん、消化器がん、膠芽腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺における前癌病変、結腸がん、黒色腫、および膀胱がんからなる群より選択される、項目４２に記載の方法。
（項目４４）
前記方法は、前記サンプルおよび／または前記拡大された細胞集団から、前記細胞傷害性Ｔ細胞をさらにソートする工程であって、必要に応じて富化する工程を包含する、項目４３に記載の方法。
（項目４５）
前記疾患は、免疫不全障害であり、前記足場は、少なくとも１種のヘルパーＴ細胞特異的活性化分子および少なくとも１種のヘルパーＴ細胞特異的共刺激分子を含む、項目３８に記載の方法。
（項目４６）
前記免疫不全障害は、原発性免疫不全障害および後天性免疫不全障害からなる群より選択される、項目４５に記載の方法。
（項目４７）

前記後天性免疫不全障害は、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）に起因する、項目４６に記載の方法。
（項目４８）
前記免疫不全障害は、ディジョージ症候群（ＤＧＳ）、染色体切断症候群（ＣＢＳ）、毛細血管拡張性運動失調症（ＡＴ）およびウィスコットーオルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される遺伝性障害に起因する、項目４５に記載の方法。
（項目４９）
前記方法は、前記サンプルに由来するヘルパーＴ細胞および／または前記拡大された細胞集団をさらにソートする工程であって、必要に応じて富化する工程を包含する、項目４５に記載の方法。
（項目５０）
前記疾患は、自己免疫障害である、項目３８に記載の方法。
（項目５１）
前記活性化され、共刺激され、ホメオスタシス的に維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞は、前記被験体へと皮下投与される、項目３８に記載の方法。
（項目５２）
前記活性化され、共刺激され、ホメオスタシス的に維持され、そして必要に応じて拡大されたＴ細胞は、前記被験体へと静脈内投与される、項目３８に記載の方法。
（項目５３）
前記Ｔ細胞の集団は、前記サンプルと前記足場とを、１日間～約２０日間の間の期間にわたって接触させることによって、活性化され、共刺激され、ホメオスタシス的に維持され、そして必要に応じて拡大される、項目３８に記載の方法。
（項目５４）
Ｔ細胞の操作のための方法であって、該方法は、
項目１に記載の足場と、被験体の生物学的サンプルとを接触させる工程であって、それによって、該サンプル内に存在するＴ細胞の集団を活性化し、共刺激し、ホメオスタシス的に維持し、そして必要に応じて拡大し、それによって該Ｔ細胞を操作する工程、
を包含する方法。
（項目５５）
前記操作は、Ｔ細胞の成長、分裂、分化、拡大、増殖、活性、生存性、消耗、アネルギー、静止、アポトーシス、または死滅を促進することを包含する、項目５４に記載の方法。
（項目５６）
前記操作は、Ｔ細胞の拡大または増殖を促進することを包含する、項目５５に記載の方法。
（項目５７）
前記方法は、前記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および前記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与する、項目５４に記載の方法。
（項目５８）
前記方法は、前記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および前記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の拡大において約５０倍～５００倍の増大を付与する、項目５７に記載の方法。
（項目５９）
前記方法は、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の増大した拡大を付与する、項目５７に記載の方法。

（項目６０）
前記方法は、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の拡大において約５倍～２０倍の増大を付与する、項目５９に記載の方法。
（項目６１）
前記操作は、Ｔ細胞の代謝活性を改善することを包含する、項目５４に記載の方法。
（項目６２）
前記方法は、前記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および前記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の改善された代謝活性を付与する、項目５４に記載の方法。
（項目６３）
前記方法は、前記高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層および前記連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を含むが、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含まないコントロール足場と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の約５倍～２０倍改善された代謝活性を付与する、項目６２に記載の方法。
（項目６４）
前記方法は、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の改善された代謝活性を付与する、項目６１に記載の方法。
（項目６５）
前記方法は、前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を含む超常磁性球状ポリマー粒子（ＤＹＮＡＢＥＡＤ）と比較して、前記足場との約１週間の接触後に前記Ｔ細胞の集団の拡大において約１倍～１０倍の増大をさらに付与する、項目６４に記載の方法。
（項目６６）
前記拡大されたＴ細胞は、前記足場との接触後少なくとも約７日間にわたって代謝的に活性である、項目５４に記載の方法。
（項目６７）
前記拡大されたＴ細胞は、前記足場との接触後少なくとも約７日間にわたって凝集物を形成する、項目５４に記載の方法。
（項目６８）
前記Ｔ細胞は、ＣＤ８＋　細胞のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目６９）
前記Ｔ細胞は、ＣＤ４＋　細胞のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目７０）
前記Ｔ細胞は、ＣＤ４＋／ＦＯＸＰ３－細胞のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目７１）
前記Ｔ細胞は、ＣＤ４４＋／ＣＤ６２Ｌ－Ｔ細胞（エフェクターメモリーおよび／またはエフェクターＴ細胞）のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目７２）
前記Ｔ細胞は、ＣＤ８＋／ＣＤ６９＋　Ｔ細胞（活性化Ｔ細胞）のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目７３）
前記Ｔ細胞は、グランザイムＢ＋　ＣＤ８＋　Ｔ細胞（サイトトキシン分泌Ｔ細胞）のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。

（項目７４）
前記Ｔ細胞は、ＩＦＮγ＋　Ｔ細胞（アクチベーターサイトカイン分泌Ｔ細胞）のポリクローナル集団を生成するように選択的に拡大される、項目５４に記載の方法。
（項目７５）
前記細胞の集団は、約３日間にわたる前記足場との接触後に拡大される、項目６８～７４のいずれかに記載の方法。
（項目７６）
前記細胞の集団は、約５日間にわたる前記足場との接触後に拡大される、項目６８～７４のいずれかに記載の方法。
（項目７７）
前記操作は、消耗したＴ細胞を同定または単離することおよび必要に応じて該消耗したＴ細胞を除去することを包含する、項目５４に記載の方法。
（項目７８）
前記消耗したＴ細胞は、ＣＤ８＋／ＰＤ－１＋の細胞表面発現に基づいて同定または単離される、項目７７に記載の方法。
（項目７９）
生物学的サンプルは、被験体から得られ；そして項目１に記載の足場は、該被験体のＴ細胞をエキソビボで操作するために、該生物学的サンプルとエキソビボで接触される、項目５４に記載の方法。
（項目８０）
前記サンプルは、約１日間～約２０日間の期間にわたって前記足場と接触される、項目７９に記載の方法。
（項目８１）
前記操作されたＴ細胞によって生成される１種またはこれより多くのサイトカインまたはサイトトキシンの生成を検出する工程をさらに包含する、項目７９に記載の方法。
（項目８２）
インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、組織壊死因子α（ＴＮＦα）、ＩＬ－２、ＩＬ－１、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成をさらに検出する工程をさらに包含する、項目８１に記載の方法。
（項目８３）
前記操作されたＴ細胞は、Ｔヘルパー１（Ｔｈ１）細胞であり、前記方法は、ＩＬ－２、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）および組織壊死因子α（ＴＮＦα）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する、項目８２に記載の方法。
（項目８４）
前記操作されたＴ細胞は、Ｔヘルパー２（Ｔｈ２）細胞であり、前記方法は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０およびＩＬ－１３、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する、項目８２に記載の方法。
（項目８５）
前記操作されたＴ細胞は、細胞傷害性Ｔ（Ｔｃ）細胞であり、前記方法は、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）およびリンホトキシンα（ＬＴα／ＴＮＦβ）、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトカインの生成を検出する工程を包含する、項目５４に記載の方法。
（項目８６）
前記操作されたＴ細胞は、細胞傷害性Ｔ（Ｔｃ）細胞であり、前記方法は、グランザイムまたはパーフォリン、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるサイトトキシンの分泌を検出する工程を包含する、項目５４に記載の方法。
（項目８７）
前記操作されたＴ細胞における細胞表面マーカーの発現を検出する工程をさらに包含する

、項目７９に記載の方法。
（項目８８）
前記細胞表面マーカーは、ＣＤ６９、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ６２Ｌ、ＦＯＸＰ３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ２８、およびＣＤ１３４、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目８７に記載の方法。
（項目８９）
前記細胞表面マーカーは、ＣＤ３６、ＣＤ４０、およびＣＤ４４、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される非Ｔ細胞マーカーである、項目８７に記載の方法。
（項目９０）
前記被験体は、ヒトである、項目５４に記載の方法。
（項目９１）
前記足場は、Ｔ細胞を含む前記生物学的サンプルが該足場とインビボで接触することを可能にするために、前記被験体に投与される、項目５４に記載の方法。
（項目９２）
前記足場は、約７日間の期間にわたって前記被験体において維持される、項目９１に記載の方法。
（項目９３）
項目１に記載の足場を作製するための方法であって、該方法は、
（ａ）高表面積メソポーラスシリカマイクロロッド（ＭＳＲ）を含む基部層を提供する工程；
（ｂ）Ｔ細胞ホメオスタシス因子を該ＭＳＲ上に必要に応じて負荷する工程；
（ｃ）連続流体支持脂質二重層（ＳＬＢ）を、該ＭＳＲを含む基部層上に層化する工程であって、それによって、ＭＳＲ－ＳＬＢ複合材を生成する工程；
（ｄ）工程（ｂ）が行われなかった場合に、該Ｔ細胞ホメオスタシス因子を、該ＭＳＲ－ＳＬＢ複合材上に負荷する工程；
（ｅ）該ＭＳＲ－ＳＬＢ複合材における１またはこれより多くの非特異的組み込み部位を、遮断因子で必要に応じて遮断する工程；ならびに
（ｆ）前記Ｔ細胞活性化分子および前記Ｔ細胞共刺激分子を、該ＭＳＲ－ＳＬＢ複合材上に負荷する工程であって、それによって、項目１に記載の足場を作製する工程、
を包含する方法。
（項目９４）
複数の足場をアセンブリルする工程であって、Ｔ細胞の浸潤を可能にするために十分な多孔性を有する積み重ねを生成する工程をさらに包含する、項目９３に記載の方法。
（項目９５）
増殖因子、サイトカイン、インターロイキン、接着シグナル伝達分子、インテグリンシグナル伝達分子、またはこれらのフラグメント、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも１種のさらなる薬剤を負荷する工程をさらに包含する、項目９３に記載の方法。

【図１】

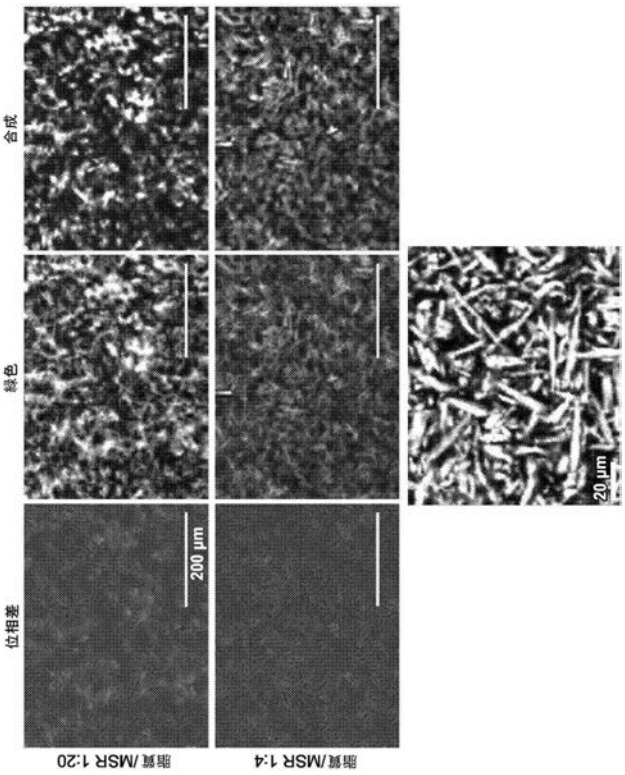


FIG. 1

【図２】

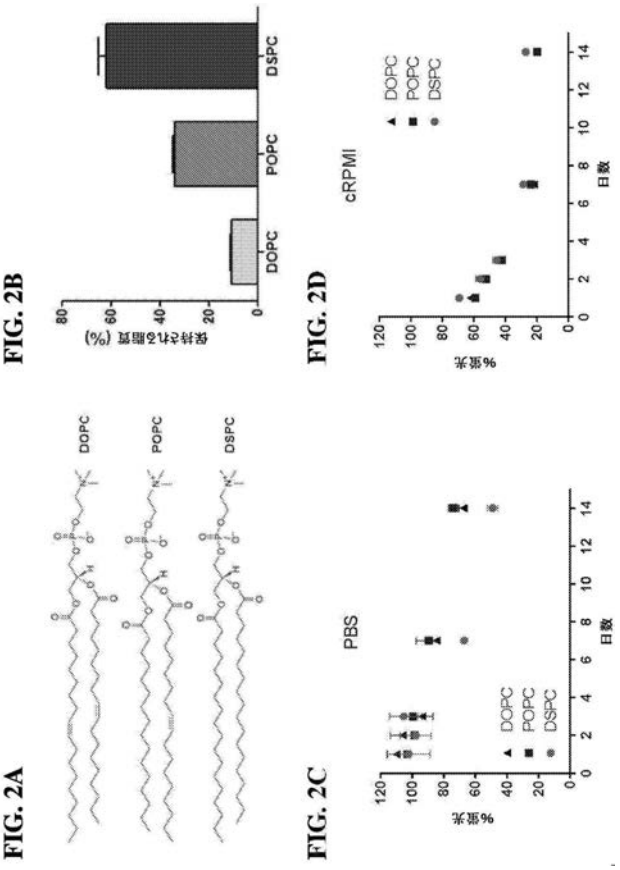


FIG. 2B

FIG. 2A

FIG. 2D

FIG. 2C

【図３】

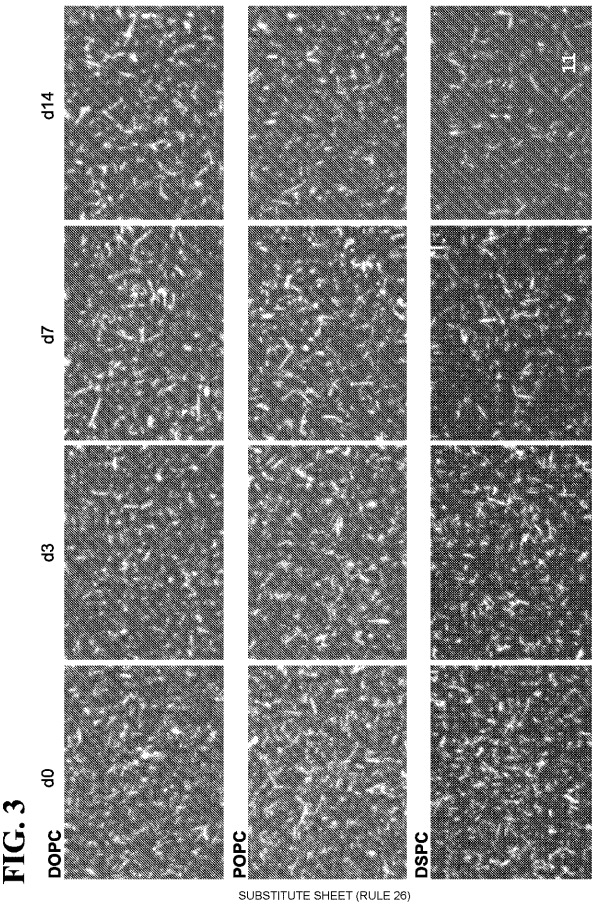


FIG. 3

【図４ＡＢＣ】

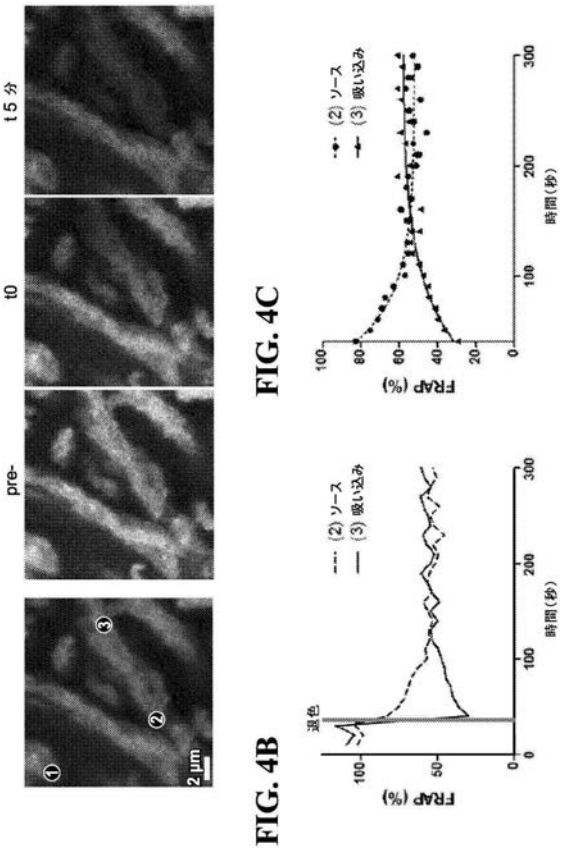
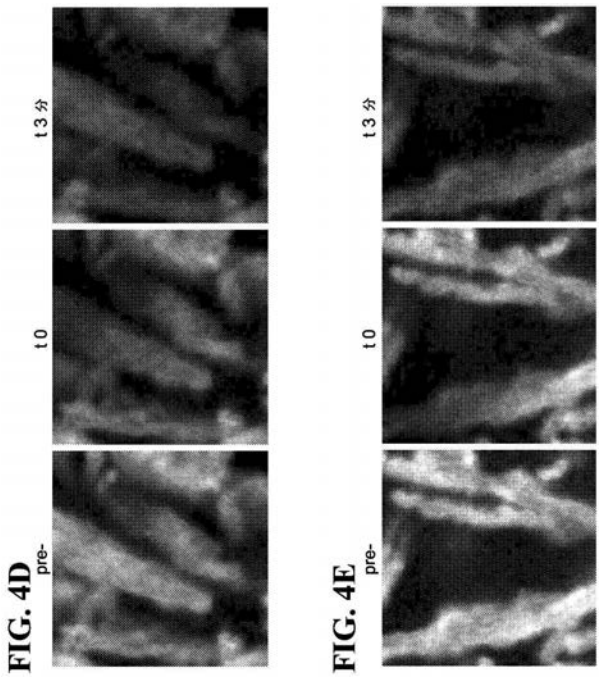


FIG. 4A

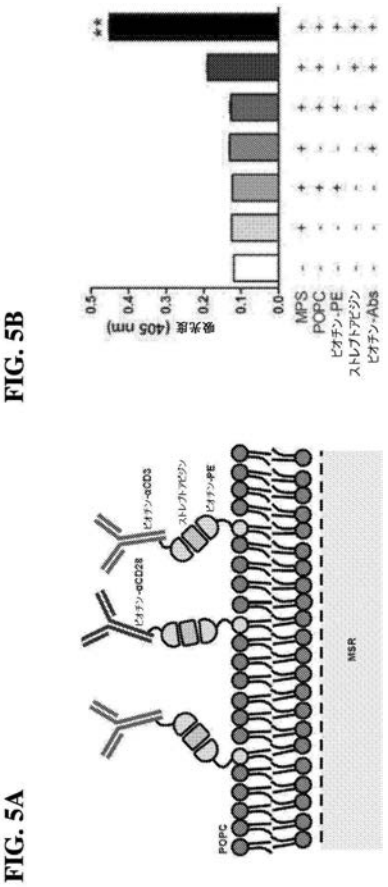
FIG. 4C

FIG. 4B

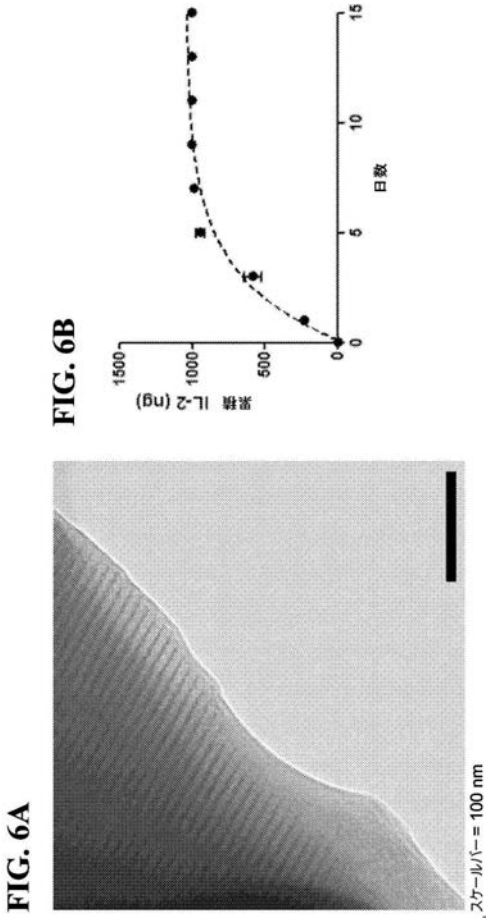
【図４ＤＥ】


FIG. 4D
pre-
t0
t3分
FIG. 4E
pre-
t0
t3分

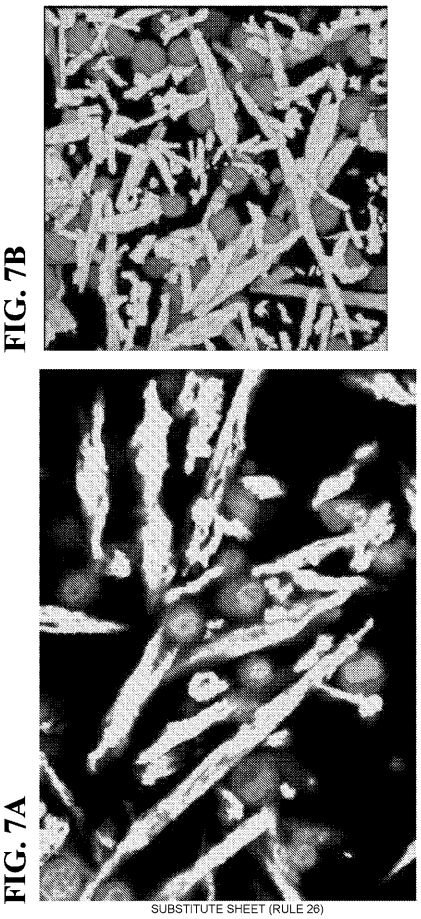
【図５】


FIG. 5B
**
吸光度 (405 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
MPS
POPC
ビオチン-PE
ストレプトアビジン
ビオチン-Abs
FIG. 5A
POPC
MSR

【図６】


FIG. 6B
累積 IL-2 (ng)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
日数
FIG. 6A
スケールバー = 100 nm

【図７】


FIG. 7B
FIG. 7A

【図８】

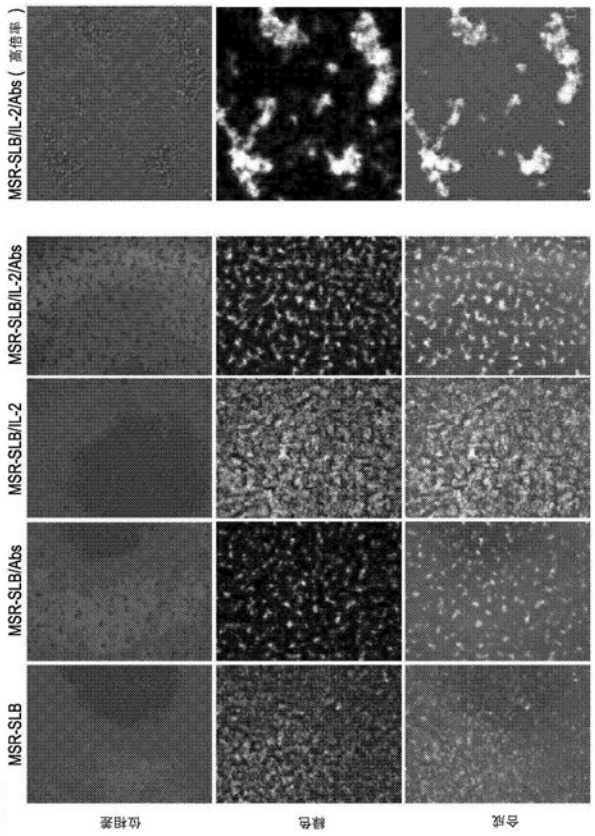


FIG. 8

【図９】

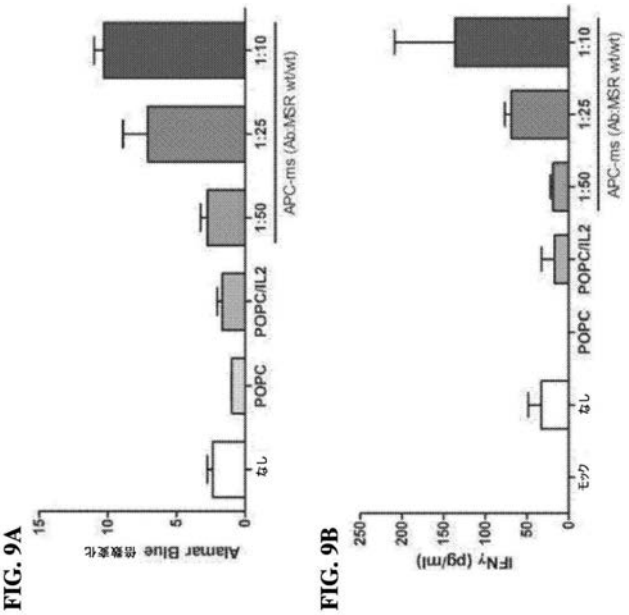


FIG. 9A

FIG. 9B

【図１０】

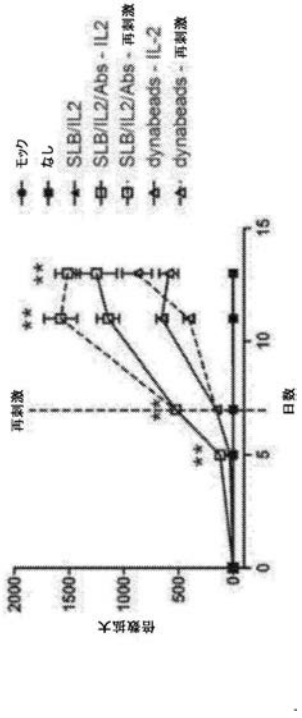


FIG. 10

【図１１】

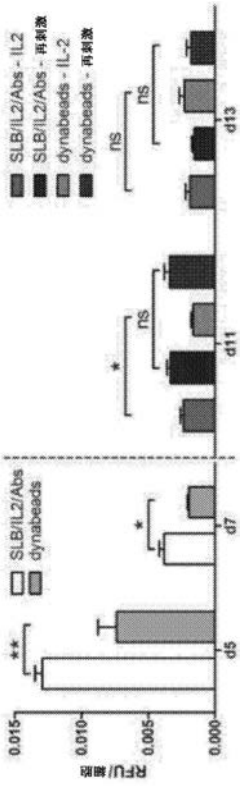
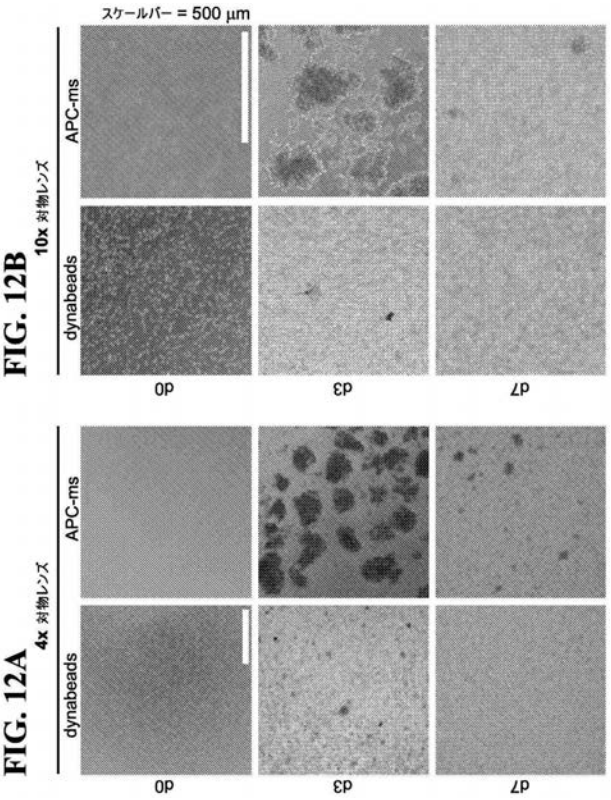
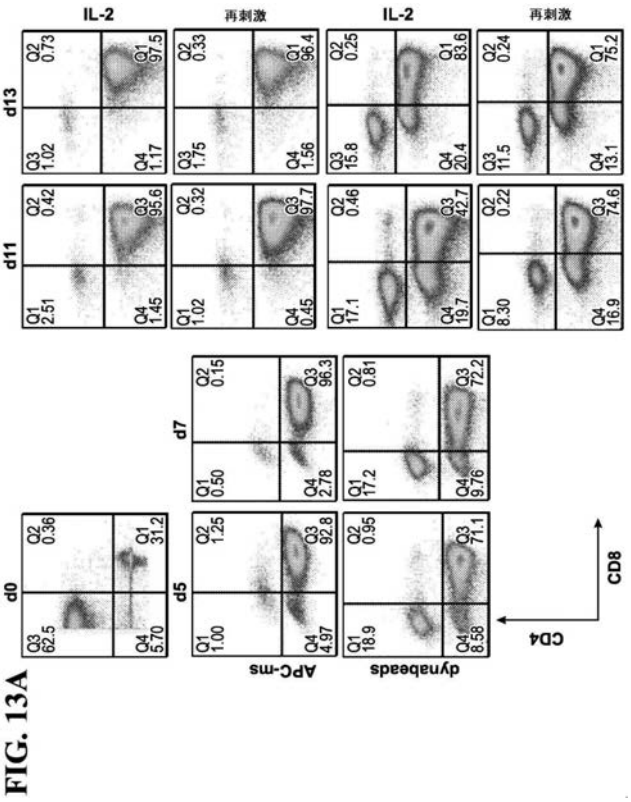


FIG. 11

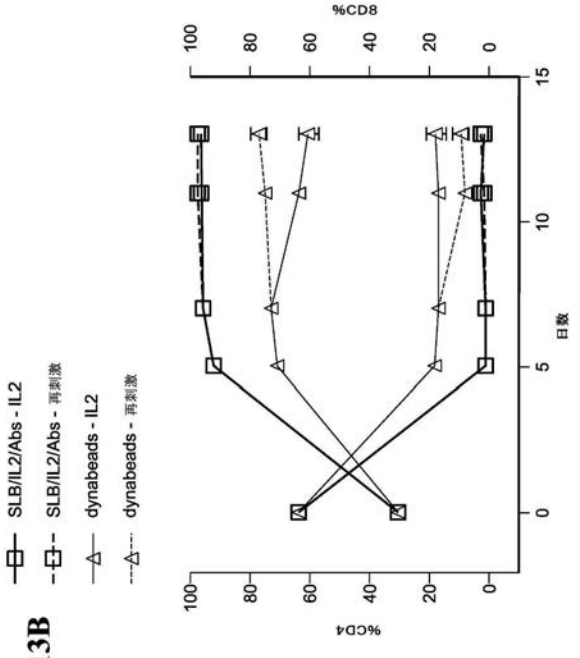
【図１２】



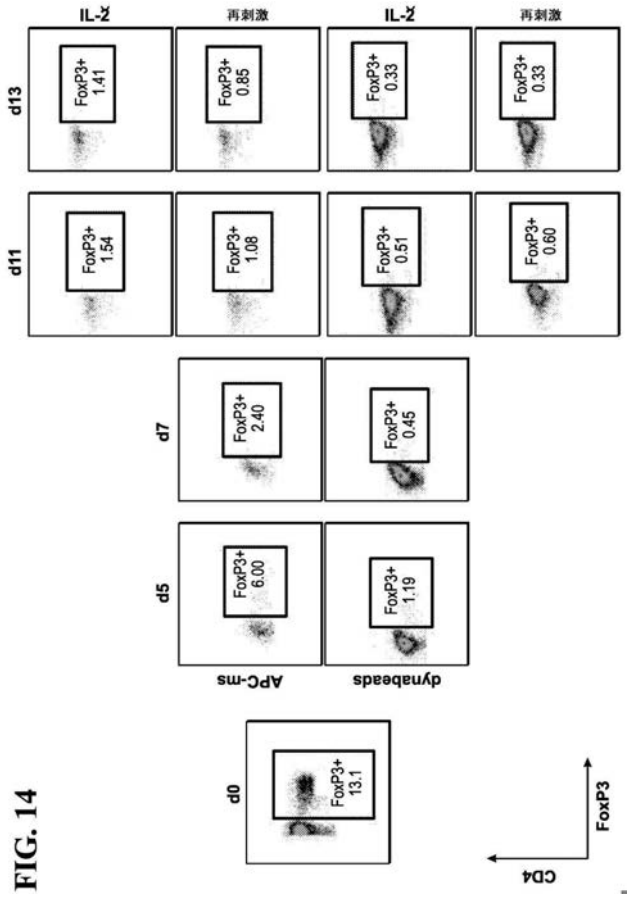
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【図１４】



【図１５】

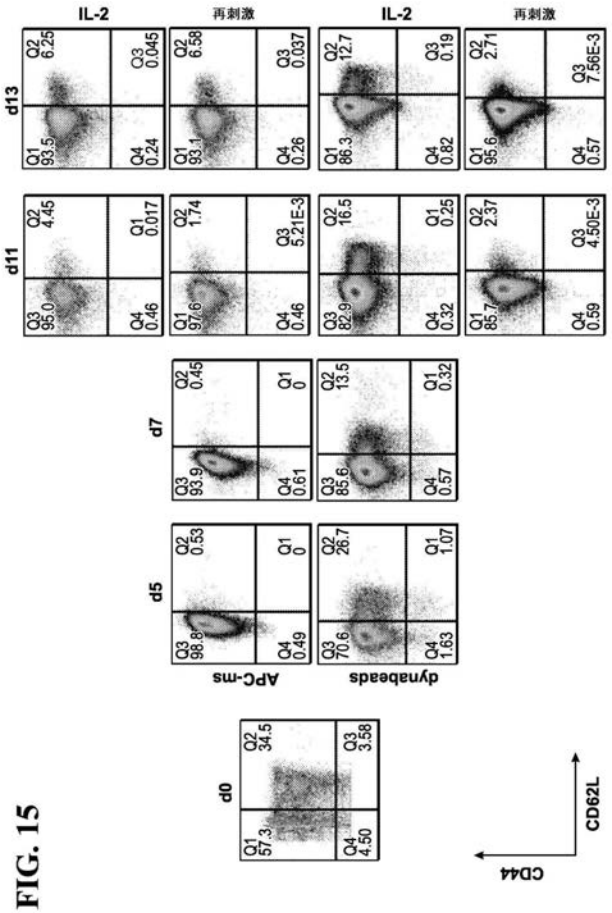


FIG. 15

【図１６】

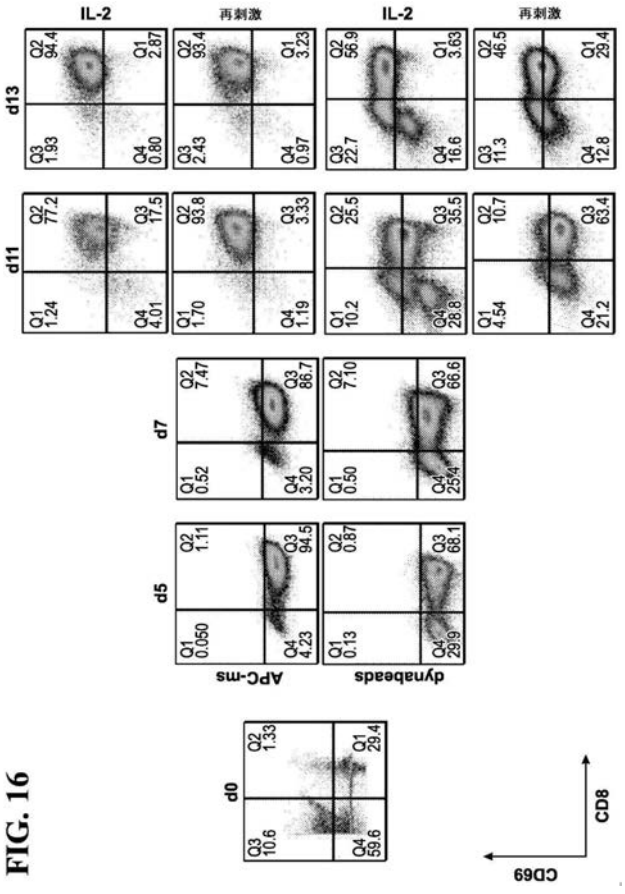


FIG. 16

【図１７】

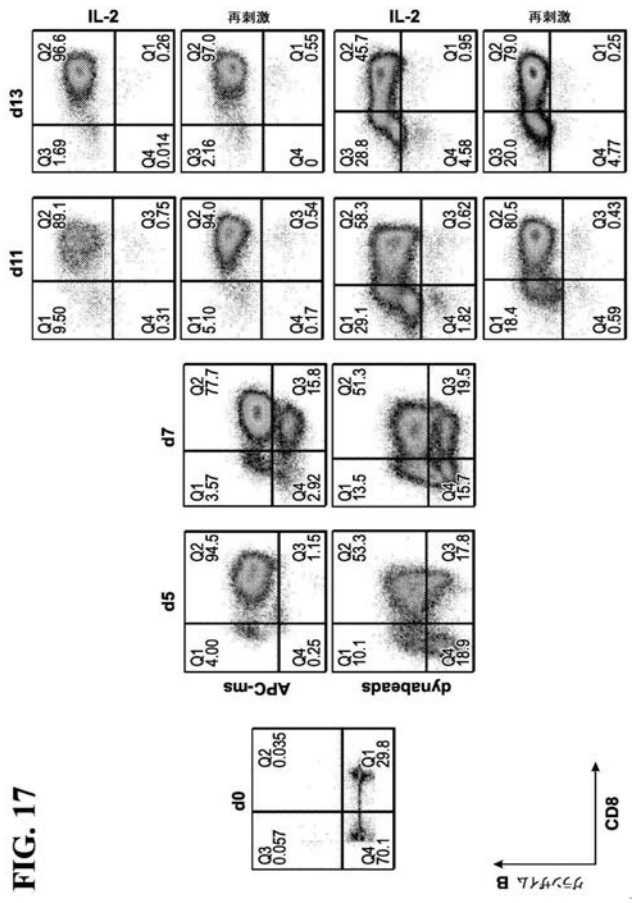


FIG. 17

【図１８】

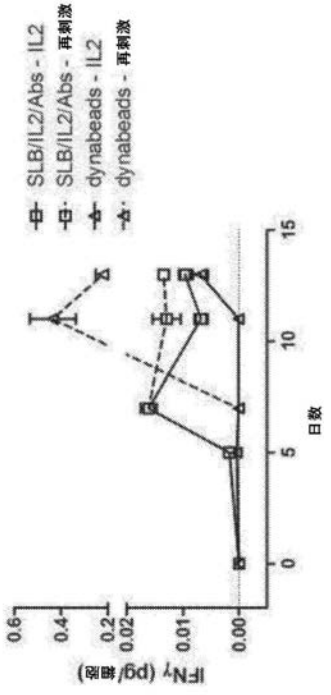


FIG. 18

【図１９】

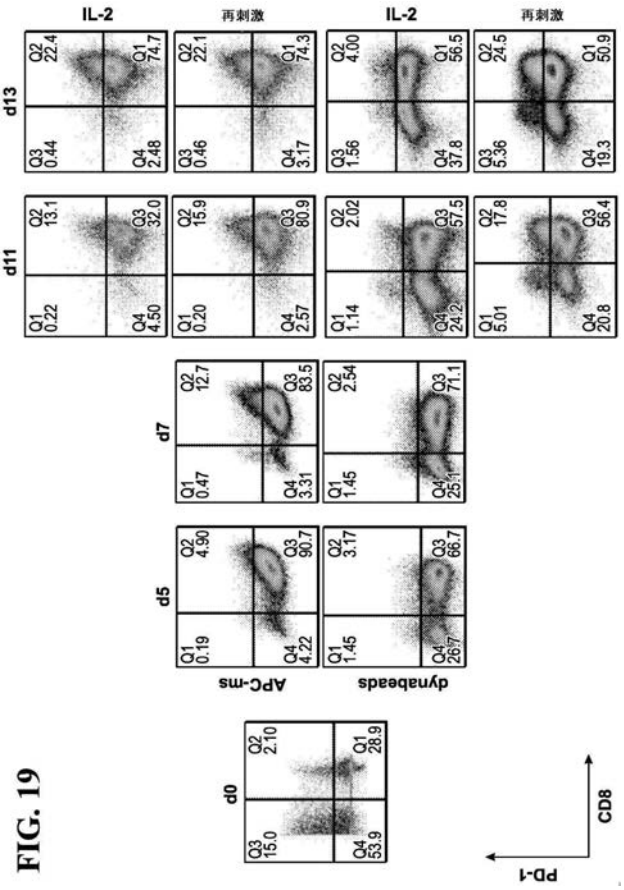


FIG. 19

【図２０】

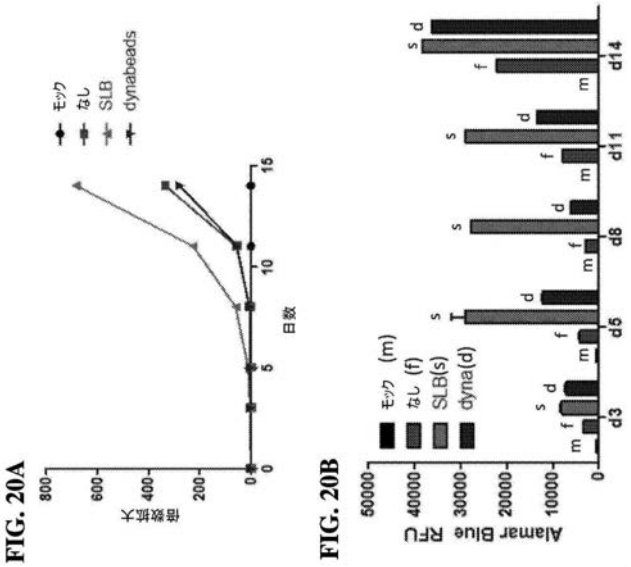


FIG. 20A

FIG. 20B

【図２１】

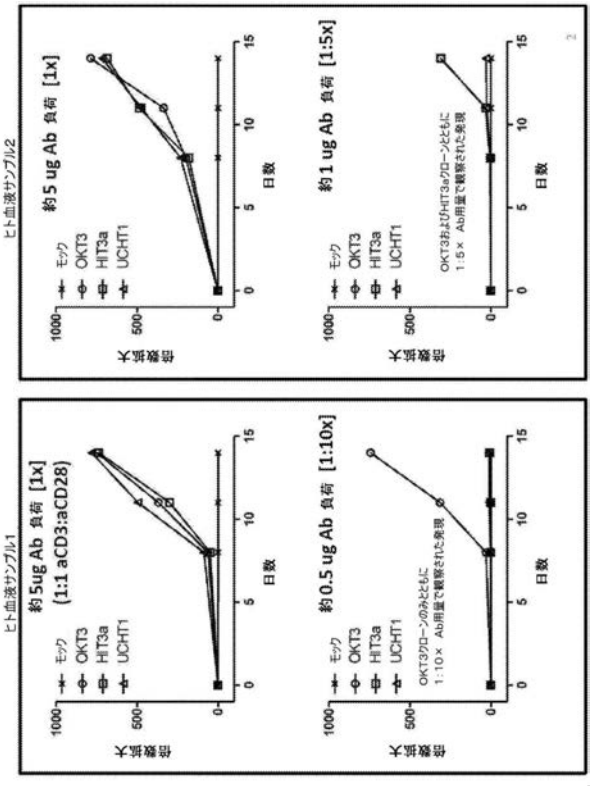


FIG. 21A

FIG. 21B

【図２２】

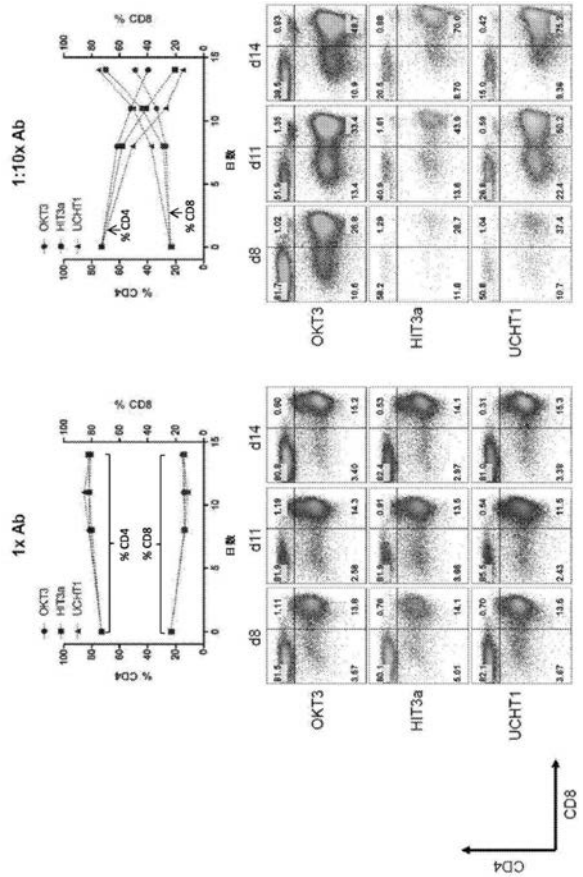


FIG. 22

【図２３】

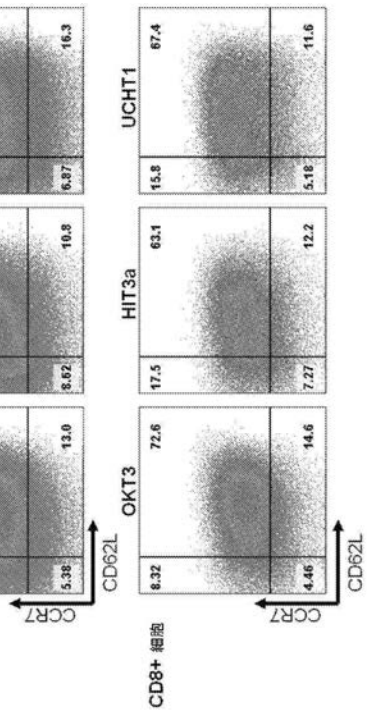


FIG. 23

【図２４】

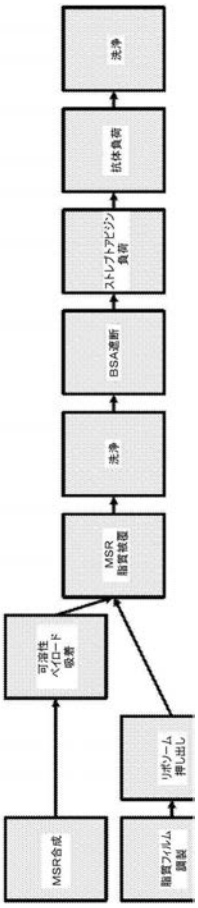


FIG. 24

【図２５】

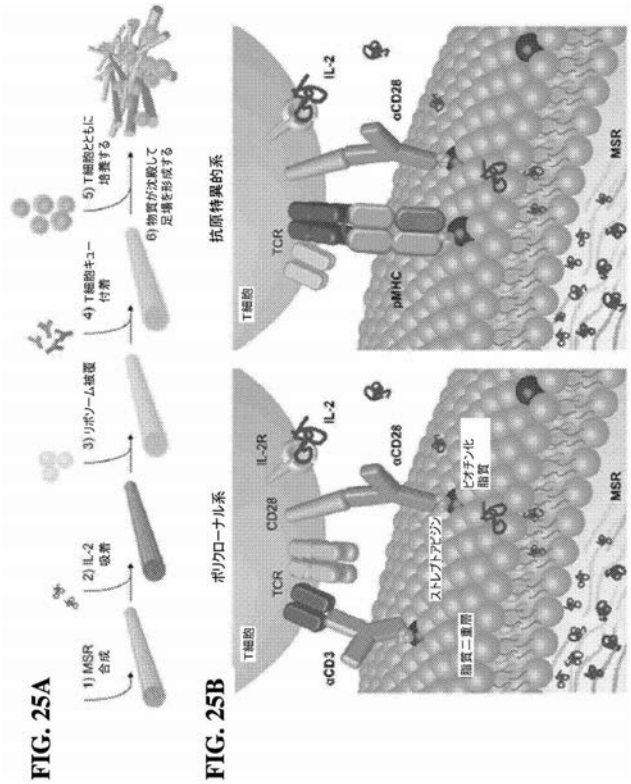


FIG. 25A

FIG. 25B

【図２６】

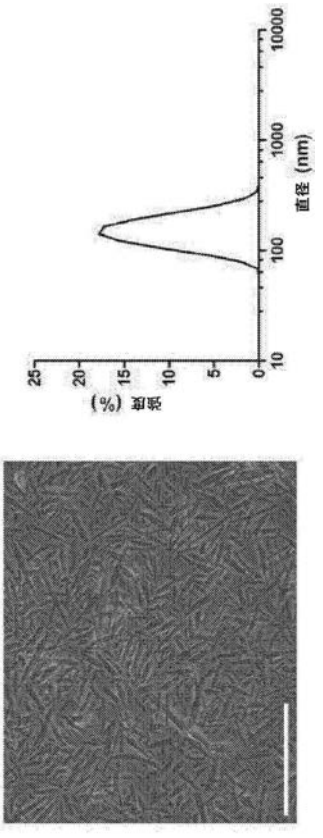


FIG. 26B

FIG. 26A

【図２７】

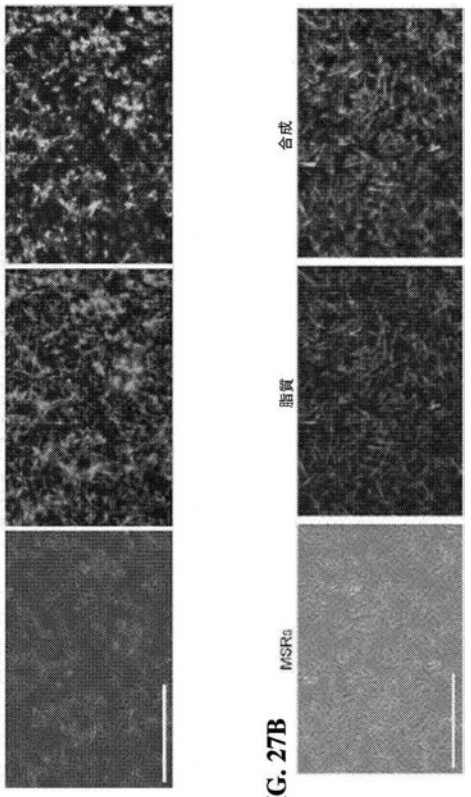


FIG. 27A

FIG. 27B

【図２８ＡＢ】

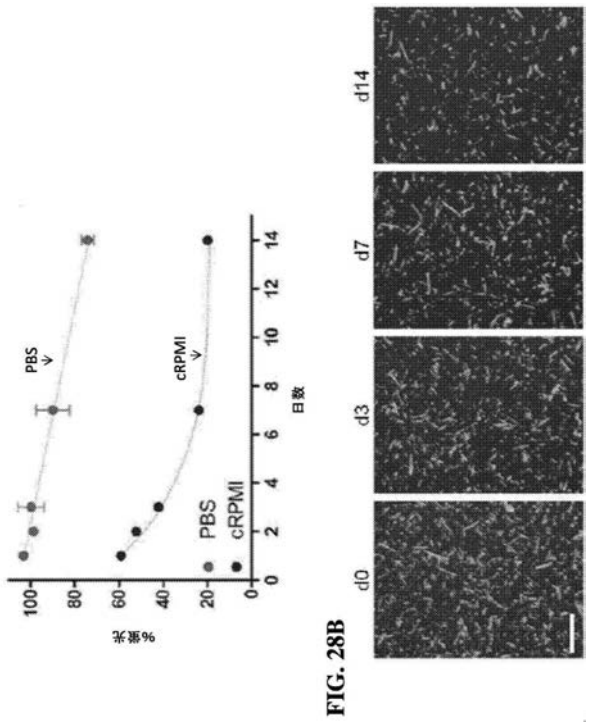


FIG. 28A

FIG. 28B

【図２８ＣＤＥ】

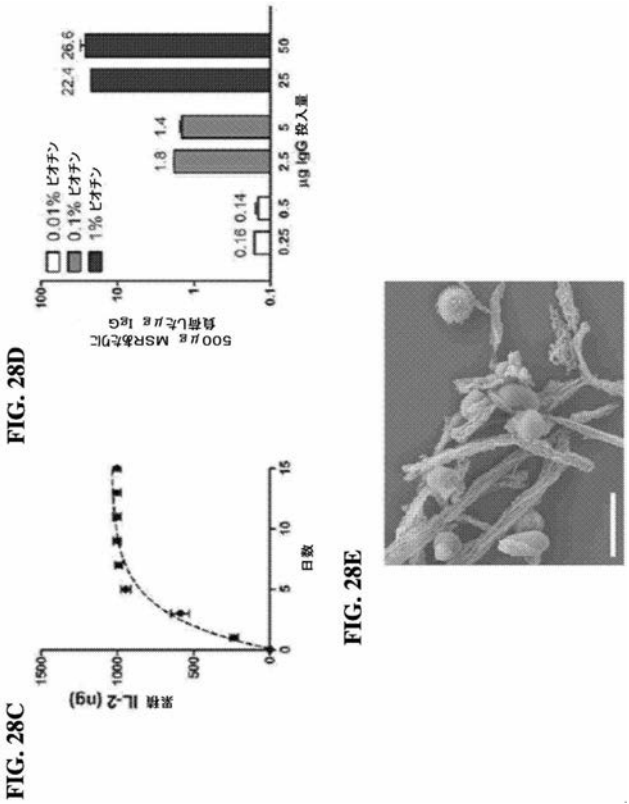


FIG. 28C

FIG. 28D

FIG. 28E

【図２９】

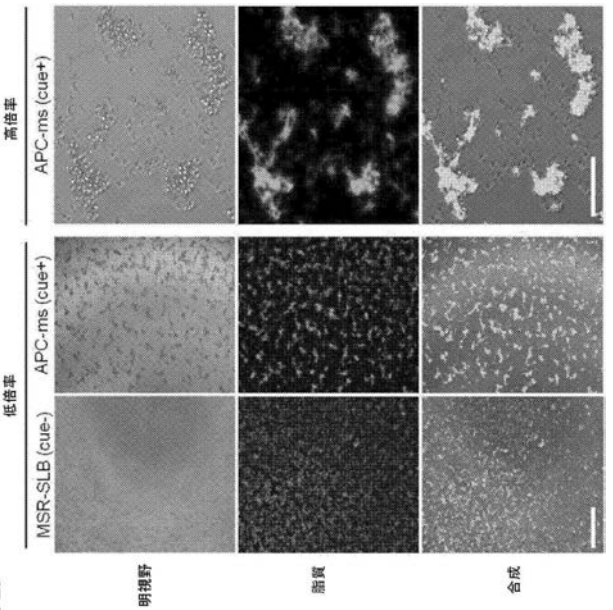
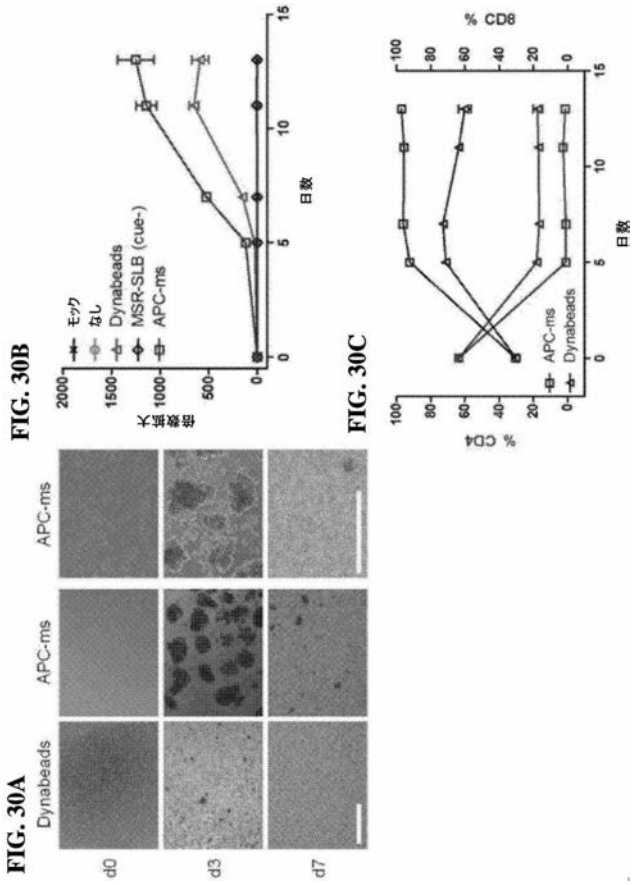
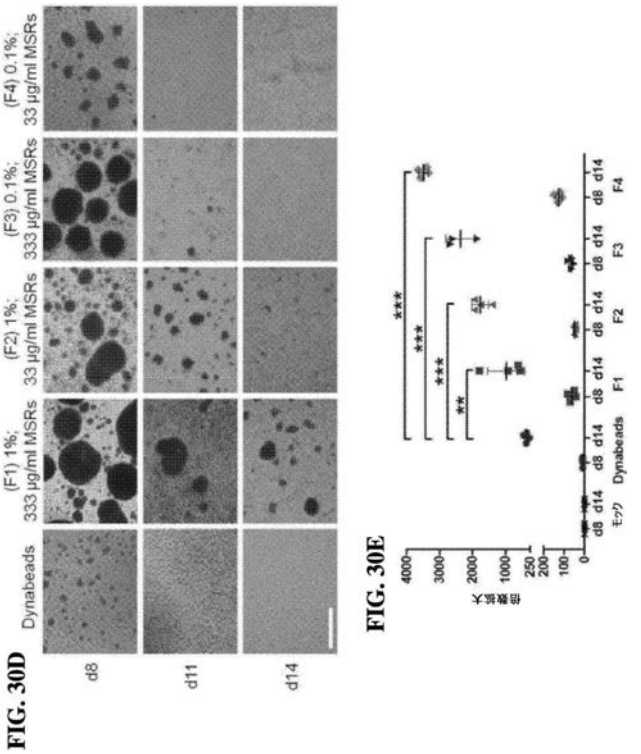


FIG. 29

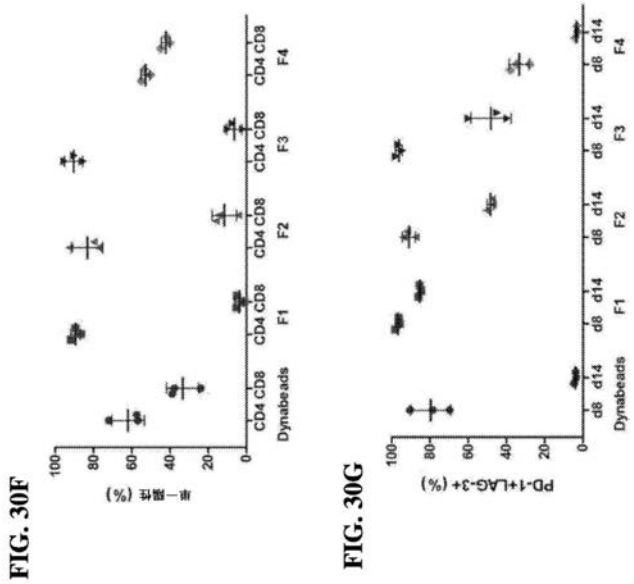
【図３０ＡＢＣ】



【図３０ＤＥ】



【図３０ＦＧ】



【図３１】

【図３２ＡＢ】

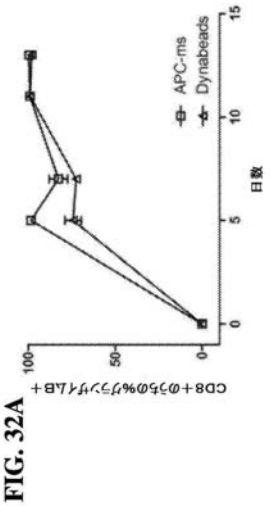


FIG. 32A

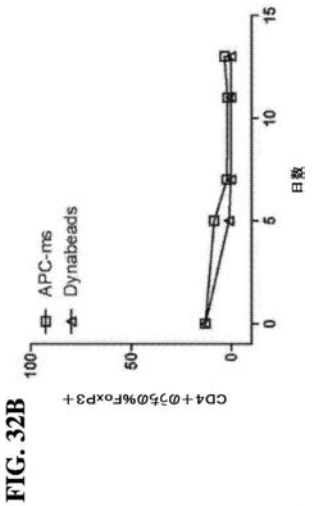


FIG. 32B

【図３２ＣＤ】

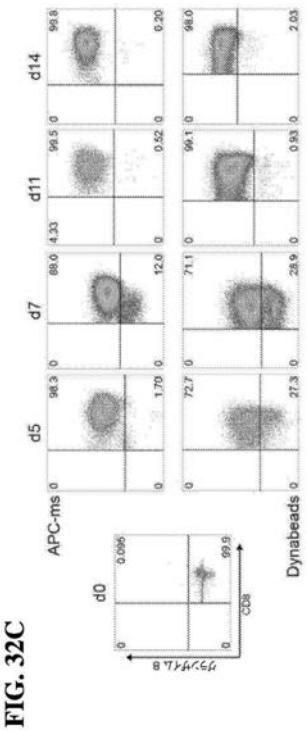


FIG. 32C

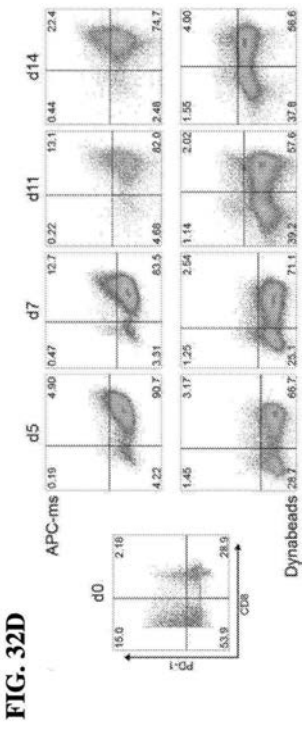


FIG. 32D

【図３３】

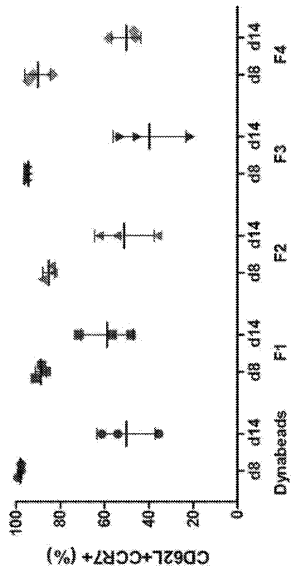


FIG. 33

【図３４ＡＢＣＤ】

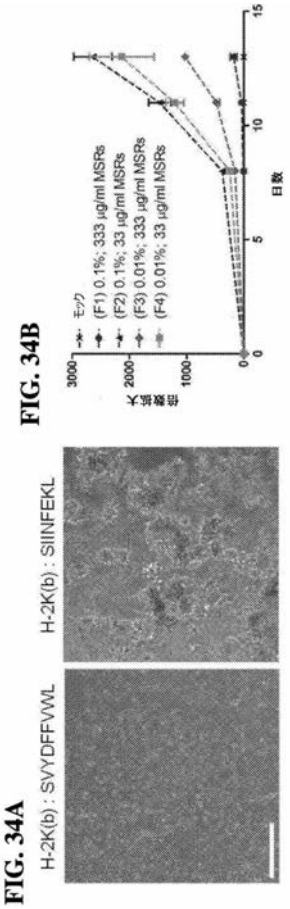


FIG. 34A

FIG. 34B

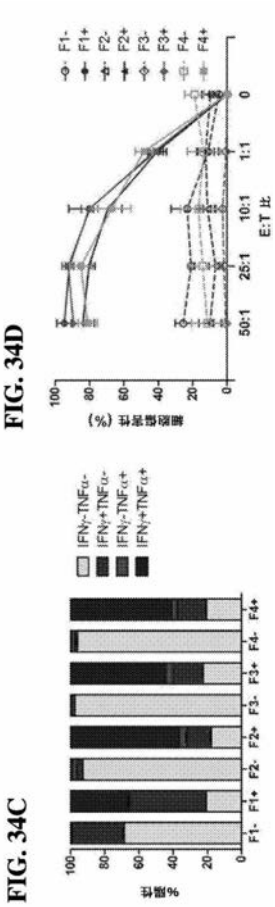


FIG. 34D

FIG. 34C

【図３４Ｅ】

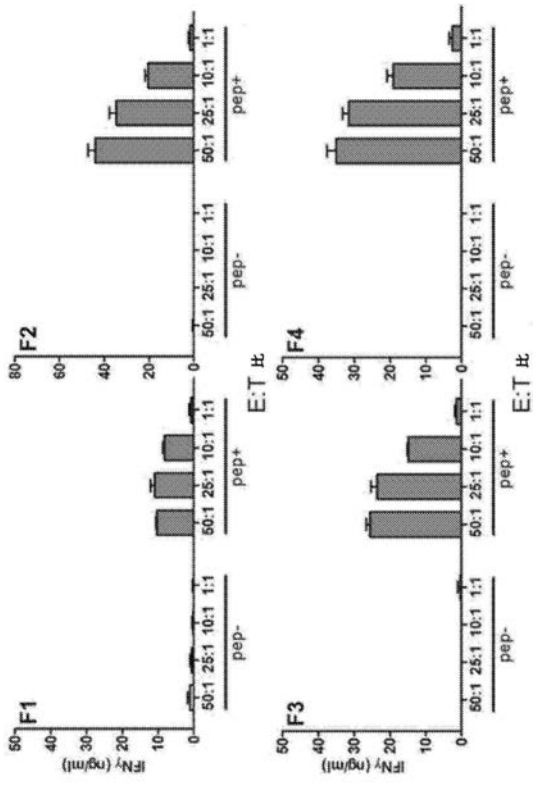


FIG. 34E

【図３５ＡＢＣＤ】

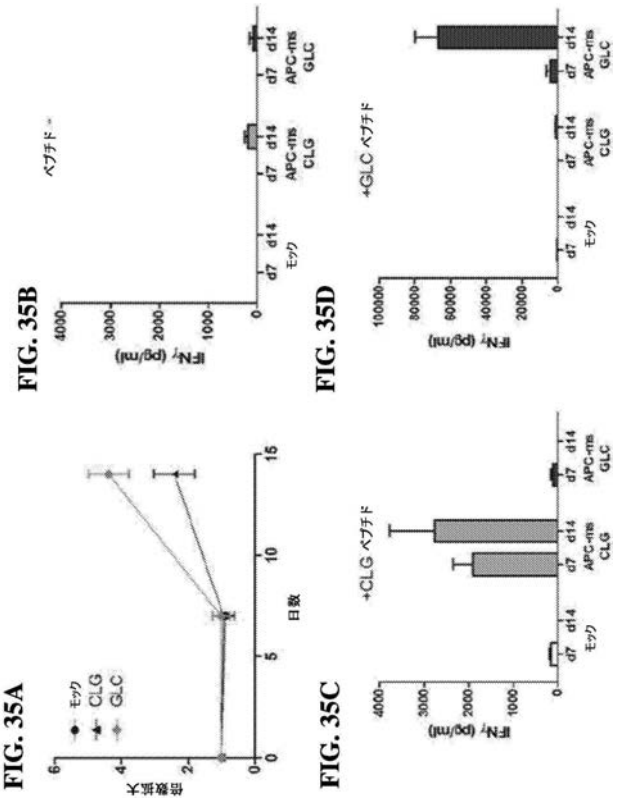


FIG. 35B

FIG. 35D

FIG. 35A

FIG. 35C

【図３５Ｅ】

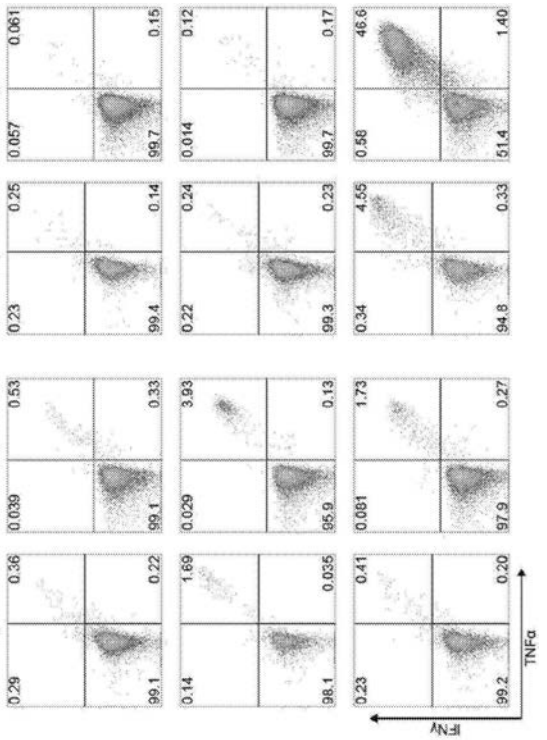


FIG. 35E

【図３６ＡＢＣ】

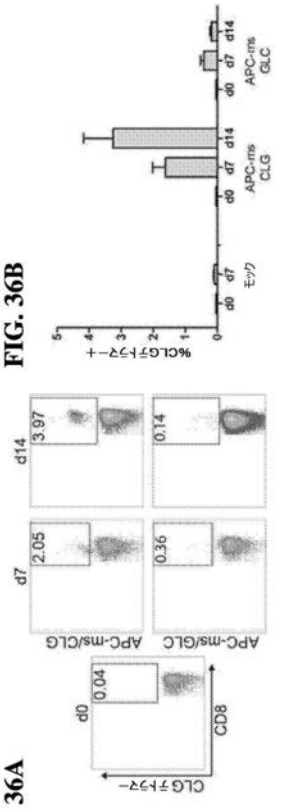


FIG. 36B

FIG. 36A

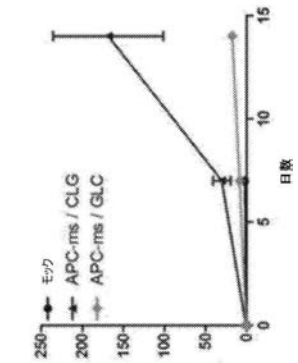


FIG. 36C

【図３６ＤＥＦ】

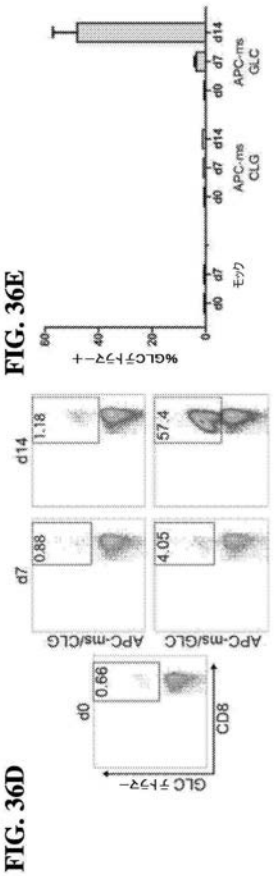


FIG. 36E

FIG. 36D

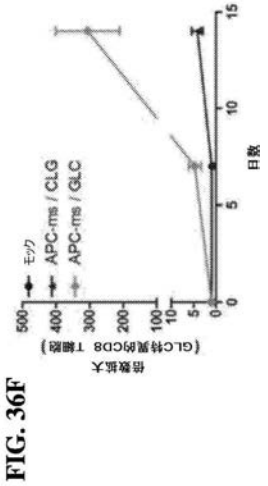


FIG. 36F

【図３６ＧＨＩＪ】

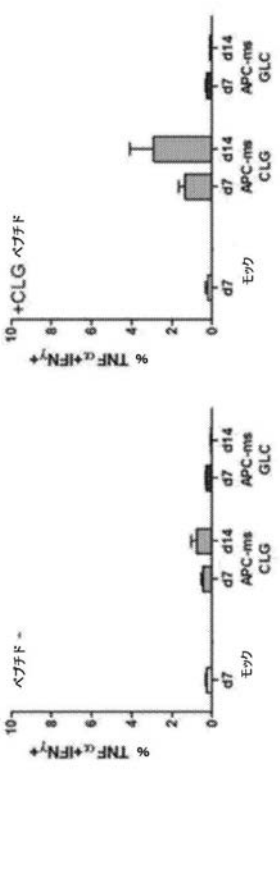


FIG. 36H

FIG. 36G

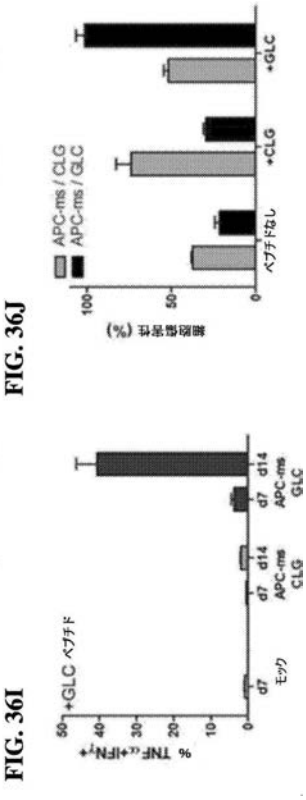


FIG. 36J

FIG. 36I

【図３６ＫＬＭＮ】

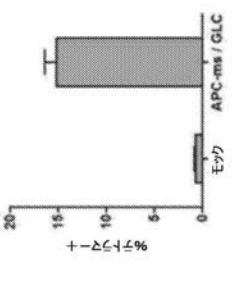


FIG. 36K

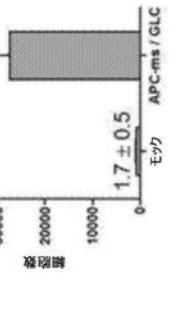


FIG. 36L

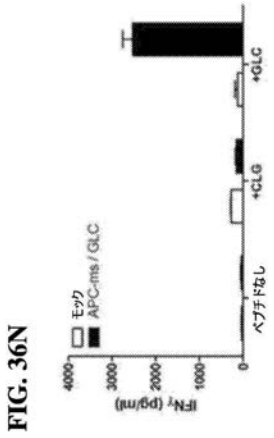


FIG. 36N

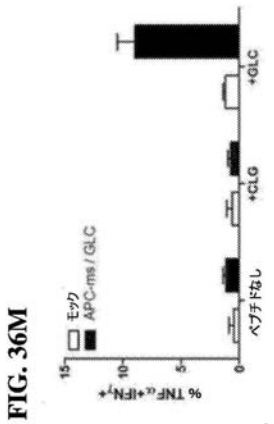


FIG. 36M

【図３７】

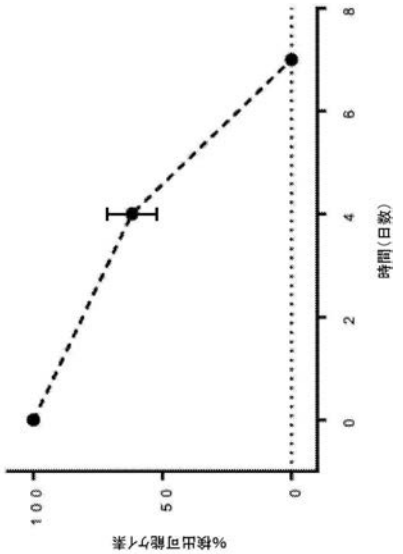
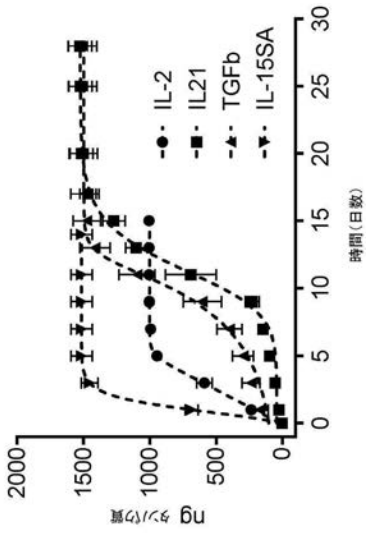


FIG. 37

【図３８】

FIG. 38



【図３９】

FIG. 39B

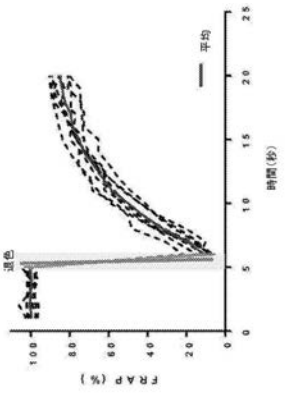
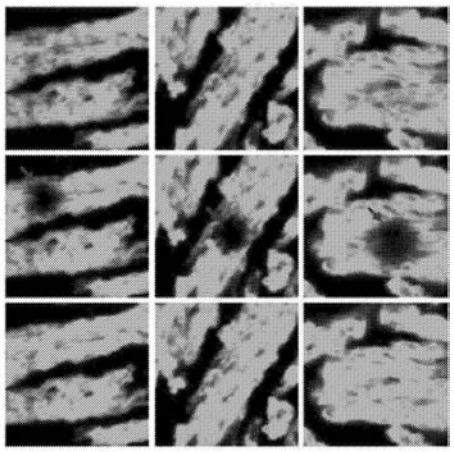


FIG. 39A

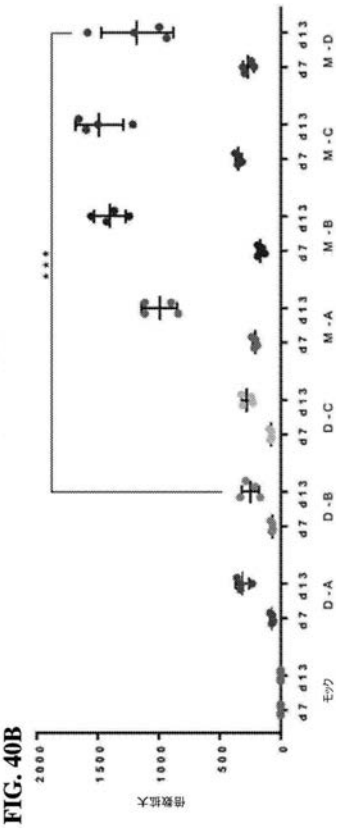


【図４０ＡＢ】

FIG. 40A



FIG. 40B



【図４０ＣＤ】

FIG. 40C

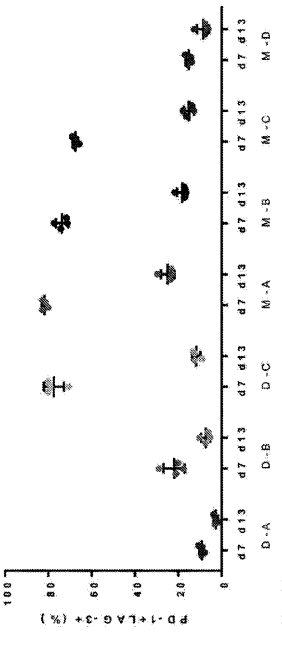
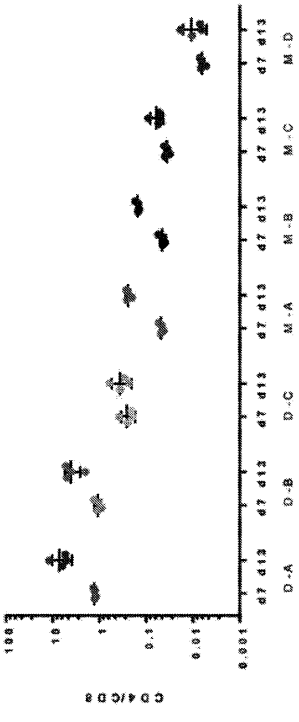


FIG. 40D



【図４１】

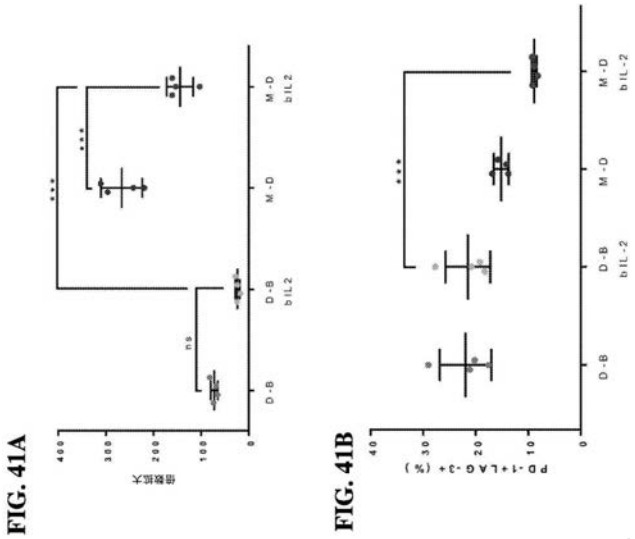


FIG. 41A

FIG. 41B

【図４２】

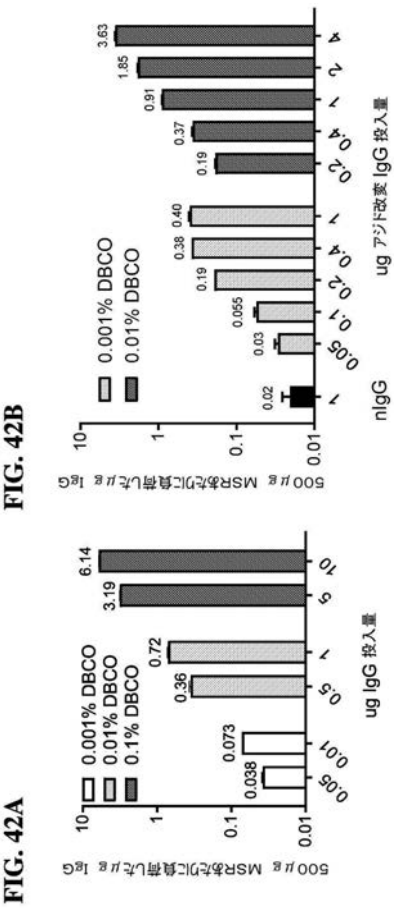


FIG. 42B

FIG. 42A

【配列表】

2022001069000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
A61P	***37/06***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/06		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
A61P	***31/18***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/18		
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/47		
C07K	*17/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	17/00		
C12M	*3/00*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｍ	3/00	Ａ	

(72)発明者　デイビッド　ジェイ．　ムーニー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１７７６，　サドベリー，　パワーズ　ロード　２７

Ｆターム(参考) 4B029 AA03 AA27 BB11 CC02 EA16
4B065 AA92X AC20 BA21 BB19 BB34 BC41 BD14 CA44
4C087 AA01 AA02 BB37 CA04 MA66 NA14 ZB07 ZB08 ZB21 ZB26
ZB27 ZC55
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20

【外国語明細書】
2022001069000001.pdf