

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529080

(P2017-529080A)

(43) 公表日 平成29年10月5日(2017.10.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 K	
G O 1 N 33/553 (2006.01)	G O 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-515062 (P2017-515062)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月17日 (2015. 9. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月8日 (2017. 5. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/050593
 (87) 国際公開番号 W02016/044530
 (87) 国際公開日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)
 (31) 優先権主張番号 62/051, 660
 (32) 優先日 平成26年9月17日 (2014. 9. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/170, 541
 (32) 優先日 平成27年6月3日 (2015. 6. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 398076227
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
 イー
 アメリカ合衆国、メリーランド州 212
 18、ボルチモア、ノース・チャールズ・
 ストリート 3400
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原特異的T細胞を同定、濃縮、及び／または増殖させるための試薬及び方法

(57) 【要約】

ナイーブT細胞を含み、稀な前駆体細胞を含む抗原特異的T細胞を、濃縮しかつ培養下で増殖させる。濃縮及び増殖は、養子移入によるより有効な免疫療法のためのプラットフォーム、ならびに、候補ペプチド抗原のライブラリーとのT細胞反応性を決定することによる個別化免疫療法のためのプラットフォームを提供する。

Fig. 1A

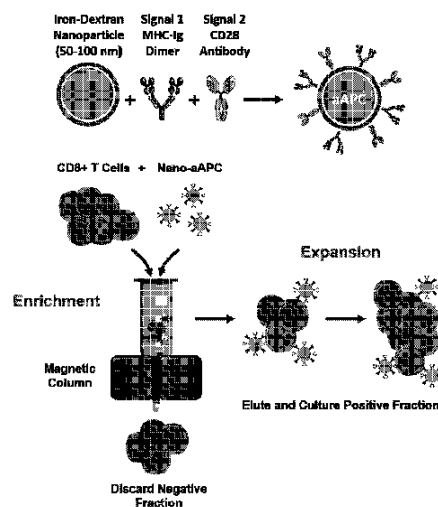


Fig. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原特異的 T 細胞集団を調製するための方法であって、
 患者または適切なドナー由来の T 細胞を含む試料を提供する段階と、
 前記試料を、常磁性であり、かつ表面上に MHC - ペプチド抗原提示複合体を含む第 1
 の粒子集団と接触させる段階であって、前記粒子が直径約 10 ~ 約 500 nm である、前
 記段階と、
 前記常磁性粒子に近接して磁場を配置する段階と、
 前記磁気粒子と会合した抗原特異的 T 細胞を回収する段階と
 を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記抗原特異的 T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパー T 細胞、または制御性 T 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗原特異的 T 細胞が CD8 + 細胞傷害性 T リンパ球である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 T 細胞が患者由来であり、前記患者が癌患者である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記癌が固形腫瘍である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記癌が、黒色腫、結腸癌、十二指腸癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腺管癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮内膜癌、精巣癌、胃癌、異形成口腔粘膜、ポリープ症、頭頸部癌、侵襲性口腔癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、移行細胞及び扁平細胞泌尿器癌、脳癌、神経芽腫、及び神経膠腫である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌が黒色腫である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記癌が血液学的悪性腫瘍である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗原特異的 T 細胞が CD8 + 細胞傷害性 T リンパ球及び / または CD4 + ヘルパー T 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記 T 細胞が患者由来であり、前記患者が感染性疾患を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 T 細胞が制御性 T 細胞であり、前記患者が自己免疫疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

T 細胞を含む前記試料が、養子移入レシピエントと HLA が適合する適切なドナー由来のものであり、前記回収された抗原特異的 T 細胞が前記レシピエントに養子移入される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

T 細胞を含む前記試料が、末梢血単核細胞 (PBMC) 試料、記憶 T 細胞、ナイーブ T 細胞、以前活性化された T 細胞、及び腫瘍浸潤性リンパ球からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

T 細胞を含む前記試料が、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、または腫瘍由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

50

T細胞を含む前記試料が、白血球取り出しによって単離される、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記試料が、CD8+細胞、CD4+細胞、または制御性T細胞に関して濃縮されている、請求項1のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記試料が、CD8+抗原特異的T細胞に関して、前記細胞を磁場に置くことによって濃縮される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

少なくとも 10^6 個のCD8濃縮細胞が、接触させる段階、配置する段階、及び回収する段階によって、抗原特異的T細胞濃縮のために単離される、請求項16に記載の方法。

10

【請求項19】

表面上にMHC-ペプチド抗原提示複合体を含む前記常磁性粒子が、鉄デキストランビーズを含む、請求項1~18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

表面上にMHC-ペプチド抗原提示複合体を含む前記常磁性粒子が、リンパ球共刺激リガンドをさらに含む、請求項1~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記抗原提示複合体がMHCクラスIまたはMHCクラスII複合体である、請求項1~20のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項22】

前記抗原提示複合体が単量体または二量体である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記抗原提示複合体が二量体であり、前記複合体が、ジスルフィド結合によって結合する免疫グロブリン重鎖配列とMHCの融合を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記免疫グロブリン配列がIgG配列である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記MHCが、HLA-A、HLA-B、HLA-C、またはHLA-Eを含むMHCクラスI複合体である、請求項21~24のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項26】

前記MHCがHLA-A2である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記免疫グロブリン配列が、ヒト化モノクローナル抗体配列である、請求項23~26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記リンパ球共刺激リガンドが、CD28、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、B7-H3、4-1BBL、4-1BB、CD27、CD30、CD134(OX-40L)、B7h(B7RP-1)、CD40、LIGHTに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、HVEMに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、CD40Lに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、OX40に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、及び4-1BBに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片からなる群より選択される1つ以上である、請求項20に記載の方法。

40

【請求項29】

前記共刺激リガンドが、モノクローナル抗体、F(ab')₂、Fab、scFv、及び一本鎖抗体からなる群より選択される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記モノクローナル抗体または断片がヒト化されている、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記共刺激リガンドが、CD28に対するヒト化マウスモノクローナル抗体または完全

50

ヒト抗体である、請求項 20 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記共刺激リガンドがヒト化モノクローナル抗体 9 . 3 またはその抗原結合断片である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記磁気粒子が、約 20 ~ 約 200 nm 内のサイズを有する、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記抗原提示複合体及び前記共刺激リガンドが、前記常磁性粒子の前記表面に共有結合している、請求項 20 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 35】

前記粒子が実質的に球状である、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記粒子が非球状である、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

約 3 ~ 約 10 の異なる抗原が、前記常磁性粒子集団において前記抗原提示複合体によって提示される、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記抗原提示複合体が腫瘍関連抗原を提示する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 39】

前記回収された抗原特異的 T 細胞が、抗原特異的ナイーブ T 細胞に関して濃縮されている、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 40】

前記回収された抗原特異的 T 細胞を、約 2 日間 ~ 約 9 週間培養下で増殖させる、請求項 20 ~ 39 のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

前記細胞を、磁場の存在下で培養下で増殖させる、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記抗原特異的 T 細胞を、約 5 日間 ~ 約 2 週間、または約 5 日間 ~ 約 10 日間、培養下で増殖させる、請求項 40 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記抗原特異的濃縮 T 細胞を、約 1 週間培養下で増殖させ、その後、任意で、第 2 のラウンドの濃縮及び増殖を行う、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

2、3、4、または 5 ラウンドの濃縮及び増殖を行う、請求項 40 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

少なくとも約 5 % の抗原特異的 T 細胞を生じる、請求項 1 または 44 に記載の方法。

【請求項 46】

少なくとも約 10 % の抗原特異的 T 細胞、または少なくとも約 15 % の抗原特異的 T 細胞、または少なくとも約 20 % の抗原特異的 T 細胞、または少なくとも約 25 % の抗原特異的 T 細胞を生じる、請求項 45 に記載の方法。

40

【請求項 47】

少なくとも約 10^6 個、または少なくとも約 10^7 個の抗原特異的 T 細胞が得られる、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記少なくとも約 10^6 個、または少なくとも約 10^7 個の抗原特異的 T 細胞が、養子免疫療法として、患者レシピエントに投与される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

T 細胞抗原または T 細胞レパートリの成分を同定するための方法であって、

50

対象由来の T 細胞を含む試料を提供する段階と、
各々、その表面上に M H C - ペプチド抗原提示複合体を含む常磁性粒子のライブラリー
に対して、単離された T 細胞をスクリーニングする段階であって、前記粒子が直径約 1 0
~ 約 5 0 0 n m であり、各粒子が候補ペプチド抗原を提示する、前記段階と、
前記対象の T 細胞の活性化を引き起こす、1 つ以上のペプチド抗原を同定する段階と
を含む、前記方法。

【請求項 5 0】

前記対象が癌患者である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記候補ペプチドが、前記患者の癌の遺伝子分析から予測されるペプチド抗原を含む、
請求項 5 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

前記スクリーニングする段階が、前記対象の T 細胞及び前記常磁性粒子のライブラリー
を、磁場の存在下でインキュベーションすることを含む、請求項 4 9 ~ 5 1 のいずれか一
項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記対象の T 細胞の活性化が、任意で免疫化学若しくは R T - P C R によって測定され
るサイトカイン発現によって同定されるか、または前記対象の T 細胞の活性化が、T 細胞
活性化を示す細胞内シグナル伝達を測定することによって同定される、請求項 4 9 ~ 5 2
のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

選択されたペプチド抗原が人工的抗原提示細胞上に負荷され、前記患者に投与される、
請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記同定された抗原を認識する T 細胞をエクスピボで濃縮しかつ増殖させて、前記対象
に投与する、請求項 4 9 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記対象が免疫疾患を有することが疑われ、前記常磁性粒子が、自己免疫疾患及び / ま
たは免疫疾患を示す候補ペプチドのライブラリーを提示する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記対象が感染性疾患を有することが疑われ、前記常磁性粒子が、感染性疾患を示す候
補ペプチドのライブラリーを提示する、請求項 4 9 に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

前記同定された抗原を認識する T 細胞が、
患者または適切なドナー由来の T 細胞を含む試料を提供するプロセスと、
密度勾配遠心分離またはフローサイトメトリーによって、抗原特異的 T 細胞を回収する
プロセスと、によって濃縮される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記回収された T 細胞を表現型的に特徴付ける段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方
法。

40

【請求項 6 0】

前記回収された T 細胞を培養下で増殖させる段階をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方
法。

【請求項 6 1】

前記回収された T 細胞を前記磁気粒子から単離する段階をさらに含む、請求項 1 に記載
の方法。

【請求項 6 2】

前記単離された T 細胞を、疾患の治療のために、前記疾患を有するレシピエントに注射
する段階をさらに含む、請求項 1 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

50

前記回収された T 細胞をエクスピボで培養する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記回収された T 細胞が、前記試料中に 10^{-6} 個未満の T 細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記試料が、養子移入レシピエントに対して H L A 不適合である適切なドナー由来の T 細胞を含み、前記回収された抗原特異的 T 細胞が前記レシピエントに養子移入される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記抗原提示複合体及び前記共刺激リガンドが、抗体によって前記常磁性粒子の表面に結合される、請求項 2 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 7】

前記抗原提示複合体が、前記患者の腫瘍の遺伝子分析から予測されるネオ抗原を提示し、前記ネオ抗原が、パッセンジャー突然変異、ドライバー突然変異、癌遺伝子形成突然変異、及び腫瘍抑制因子破壊突然変異からなる群より選択される突然変異によって形成される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記抗原提示複合体が、前記患者の腫瘍の遺伝子分析から予測される抗原を提示する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗原を前記患者にワクチン接種する段階をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

20

【請求項 7 0】

前記抗原で前記患者の T 細胞を刺激する段階をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記抗原特異的 T 細胞が 1 つ以上の活性化マーカーを発現する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記常磁性粒子が、その表面上に、少なくとも 5 つの M H C - ペプチド抗原提示複合体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記常磁性粒子が、その表面上に、少なくとも 1 0 の M H C - ペプチド抗原提示複合体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 7 4】

前記常磁性粒子が、その表面上に、少なくとも 5 つのリンパ球共刺激リガンド分子を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記常磁性粒子が、その表面上に、少なくとも 1 0 のリンパ球共刺激リガンド分子を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記常磁性粒子が、その表面上に、M H C - ペプチド抗原提示複合体を含み、前記試料を、リンパ球共刺激リガンドを含む第 2 の粒子とさらに接触させる、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 7】

前記疾患が慢性感染性疾患である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記接触させる段階が、前記集団の限界希釈を使用する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記抗原特異的 T 細胞から m R N A を単離する段階と、前記 m R N A または前記 m R N A 由来の c D N A に対して配列決定反応を実行する段階と、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 80】

前記常磁性粒子が検出可能に標識され、前記方法が、T細胞活性化マーカーの発現に関して、前記抗原特異的T細胞をアッセイすることをさらに含む、請求項71に記載の方法。

【請求項 81】

前記抗原提示複合体及び前記共刺激リガンドが、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン結合対によって、前記常磁性粒子の表面に結合される、請求項20～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記表現型の特徴付けが、CD62L、CD45RA、PD-1、CTLA-4、Tim-3、Lag-3、及びIC5からなる群より選択されるマーカーに関してアッセイすることを含む、請求項59記載の方法。

10

【請求項 83】

前記スクリーニングする段階の前に、抗原に特異的である前記試料中のT細胞に関して濃縮する段階をさらに含む、請求項49に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願の主題は、免疫療法に関し、かつ2014年3月13日出願のPCT/US2014/25889に開示される主題に関連し、該文献の内容は本明細書に援用される。

20

【背景技術】

【0002】

背景

抗原特異的ナイーブ(naive)前駆体は100万あたり1個程度のことがあるほど稀であるため、抗原特異的T細胞の増殖は複雑である。養子療法に必要な多数の(例えば)腫瘍特異的T細胞を生成するために、従来法ではリンパ球を何週間にも渡って抗原で刺激し、多くの場合労働力を要するプロセスでT細胞選択及びサブクロニングが続く。

【0003】

療法及び診断の両方の目的のため、ナイーブ前駆体から、多数かつ高頻度で抗原特異的T細胞を迅速に生成するか、または候補ペプチド抗原に対するT細胞反応を迅速に同定することが可能な技術が必要である。

30

【発明の概要】

【0004】

多様な態様において、本発明は、ナイーブT細胞由来のものを含み、かつ稀な前駆体細胞由来のものを含む、抗原特異的T細胞の迅速な濃縮及び培養下での増殖を提供する。本発明は、それによって、より有効な免疫療法(例えば養子移入によるもの)のためのプラットフォームを提供する。本発明は、候補ペプチド抗原のライブラリーに対するT細胞反応性を決定することによって、患者リンパ球から抗原特異的T細胞反応を迅速に同定するためのプラットフォーム、及び個別化免疫療法のためのプラットフォームをさらに提供する。

【0005】

40

本発明は、多様な実施形態において、ナノスケールの人工的抗原提示細胞(aAPC)を使用し、該細胞は、免疫細胞、例えば抗原特異的Tリンパ球、例えばCTLを捕捉し、かつこれらの細胞に刺激シグナルを送達する。aAPC上に存在するシグナルには、主要組織適合複合体(MHC)(クラスIまたはクラスII)の状態提示される抗原性ペプチドであるシグナル1、及びT細胞反応を調節する1つ以上の共刺激リガンドであるシグナル2が含まれ得る。いくつかの実施形態において、シグナル2は、CD28に結合し、かつこれを介して活性化するリガンドである。多様な実施形態において、粒子材料は常磁性であり、好ましくは生体適合性であり、例えばデキストランコーティングされた酸化鉄粒子である。常磁性粒子は、磁場の適用によって磁性捕捉または「濃縮」を可能にし、それとともに濃縮細胞画分内の抗原特異的リンパ球の活性化及びそれに続く増殖を可能に

50

し、これもまた磁場の適用によって増進される。

【0006】

いくつかの態様において、本発明は、抗原特異的T細胞集団を調製するための方法を提供する。本方法は、患者からT細胞を含む試料を提供することを含む。いくつかの実施形態において、患者に、抗原特異的T細胞を養子移入する必要がある。試料はPBMCT試料、または白血球取り出しによって得られる試料であってもよい。試料は、関心対象のT細胞、例えばCD8⁺T細胞及び/またはナイーブT細胞に関して濃縮されていてもよい。T細胞を含有する試料を、関心対象の疾患に共通の(例えば腫瘍型)抗原を提示する、及び/または個別化ベースで選択された1つ以上の抗原を提示する、常磁性aAPC集団と接触させる。特定の実施形態において、各aAPCビーズは単一の抗原を提示し、各々異なる抗原を提示するaAPCビーズのカクテルが濃縮/増殖に用いられる。常磁性特性を利用して、磁石を近接して配置しそれによって非会合細胞からaAPC会合細胞を分離することによって、抗原特異的T細胞に関して試料を捕捉するかまたは「濃縮」する。回収したT細胞は、aAPCと培養することによってインビトロで増殖可能であり、かつ磁場の存在によって、抗原特異的細胞の増殖がさらに増進される。抗原特異的細胞の最適な増殖(及びさらなる純度)のため、濃縮及び増殖プロセスを1回以上反復してもよい。

10

【0007】

特定の実施形態において、方法は、抗原特異的T細胞の約1000~10,000倍(以上)の増殖を提供し、約10⁸を超える抗原特異的T細胞が、例えば1~3週間のスパンで生成される。生じた細胞を患者に投与して疾患を治療することも可能である。同時移入された無関係の細胞からの増殖シグナルに関する競合が、関心対象の抗腫瘍T細胞の恒常的な増殖を有意に減弱させ得るため、抗原特異的頻度は、移入後の最適増殖のための独立した重要なパラメータである。

20

【0008】

さらに他の態様において、本発明は、個別化ベースでT細胞抗原を選択するための方法を提供する。例えば、各々候補抗原性ペプチドを提示するaAPCのアレイまたはライブラリーを、対象または患者由来のT細胞を用いてスクリーニングし、各aAPC-ペプチドに対するT細胞の反応を決定するかまたは定量化する。例えば、サイトカイン発現またはT細胞活性化の他の代理マーカーの発現によって、T細胞反応を定量化することも可能である。例示的なアッセイプラットフォームには、免疫化学、例えばELISA、または例えばRT-PCRによる発現された遺伝子の増幅が含まれる。他の実施形態において、T細胞活性化は、T細胞活性化の指標である細胞内シグナル伝達事象、例えばカルシウムシグナル伝達を測定することによって、定量化される。こうしたアッセイに、当該技術分野に知られる任意の多様な比色アッセイを使用することも可能である。

30

【0009】

最もロバストな反応を示すペプチド抗原が免疫療法のために選択され、免疫療法にはいくつかの実施形態において養子免疫療法が含まれ、これは、抗原特異的T細胞の濃縮及び増殖によって達成可能である。いくつかの実施形態においては、特に癌免疫療法のため、患者の腫瘍を遺伝子分析し、患者のユニークな腫瘍突然変異シグネチャーから腫瘍抗原を予測する。これらの予測された抗原(「ネオ抗原」)を合成し、aAPCプラットフォームを用いて、患者のT細胞に対してスクリーニングする。ひとたび反応性抗原が同定/確認されたら、本明細書に記載する濃縮及び増殖プロトコルのため、aAPCを調製することも可能であるし、またはいくつかの実施形態において、aAPCを患者に直接投与することも可能である。

40

【0010】

いくつかの実施形態において、患者または対象のT細胞を、各々異なる候補ペプチド抗原を提示する常磁性aAPCのアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングする。この選別は、対象または患者のT細胞レパートリーに関する豊富な情報を提供することも可能であり、その結果は、診断または予後判定目的のために有用である。例えば、突然変異タンパク質、過剰発現されたタンパク質、及び/または他の腫瘍関連抗原に対するT細胞

50

胞抗腫瘍反応の数及び同一性をバイオマーカーとして用いて、リスクを層別化するか、免疫療法の有効性を観察するか、または免疫療法治療の転帰を予測することも可能である。さらに、こうしたT細胞反応の数若しくは強度は、疾患進行リスクに反比例することも可能であるし、または化学療法に対する耐性若しくは無反応性を予測することも可能である。他の実施形態において、各々、候補ペプチド抗原を提示するナノAPCのアレイまたはライブラリーに対して、対象または患者のT細胞がスクリーニングされ、T細胞反応の存在、またはこれらのT細胞反応の数若しくは強度は、例えば、自己免疫疾患を同定するか、または患者が無症候性腫瘍を有することを同定することによって、患者の健康に関する情報を提供する。これらの実施形態において、プロセスは潜在的な疾患状態を同定するだけでなく、疾患生物学の最初の理解を提供する。

10

【0011】

本発明は、これによって、抗原特異的免疫細胞のエクスピボでの検出、濃縮、活性化、及び/または増殖が、療法的にまたは診断的に望ましい、癌、自己免疫疾患、及び他の疾患を含む、いくつかのT細胞関連疾患または状態において、診断上の及び療法上の進歩を提供する。

【0012】

本発明のさらなる態様及び実施形態は、以下の詳細な説明に基づいて、当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0013】

20

図面の説明

【図1】抗原特異的T細胞の濃縮及び増殖のための実施形態の模式図を提示する。(図1A)MHC-Ig二量体(シグナル1)及び共刺激抗CD28抗体(シグナル2)を50~100nmの鉄-デキストランナノ粒子にカップリングすることによって、ナノスケールの人工的抗原提示細胞(ナノaAPC)の実施形態を合成する。(図1B)磁気濃縮の模式図。ナノaAPCに結合した抗原特異的CD8⁺T細胞は、「濃縮」段階において、磁気カラム中に保持され、一方、非同族(non-cognate)細胞は、結合する可能性がより低い。次いで、濃縮T細胞をナノaAPCによって活性化し、「増殖」段階において、増殖させる。

【図2】ナノaAPCが仲介する抗原特異的T細胞の濃縮。(図2A)ナノaAPCは、1000倍超ポリクローナルであるThy1.2⁺B6脾臓細胞のプールから、同族であるThy1.1⁺pme1細胞の抗原特異的濃縮を仲介する。(図2B)増加する量のナノaAPCを適用して、(図2A)におけるように実行したpme1の濃縮後に回収された、抗原特異的細胞頻度及び回収された細胞パーセントの要約。(図2C)ナノaAPCによる内因性Db-gp100脾臓細胞の濃縮(上部)。非同族Kb-Trp2細胞の頻度は濃縮後も増加しない(下部)。

30

【図3】濃縮後の抗原特異的T細胞の増殖。(図3A)増殖に対する濃縮の効果を評価するために用いた細胞分画の模式図。粒子に結合した抗原特異的T細胞は磁気カラムで捕捉され(陽性画分)、一方、結合していない細胞は通過する(陰性画分)。陰性画分を陽性画分に戻して、濃縮の影響を取り消すことも可能である(陽性+陰性)。(図3B)Kb-Trp2ナノaAPCが濃縮された結果としての、培養7日後に生成される抗原特異的細胞頻度の増加。陰性(左)、陽性(中央)及び陽性+陰性(右)画分を7日間培養し、次いで、同族Kb-Trp2(上部)及び対照Kb-SIINF(下部)二量体で染色する。(図3C)細胞を濃縮した際、Kb-Trp2細胞頻度は10~15倍増加(*、t検定によって、 $p < 0.001$)。(図3D)同族ナノaAPCで7日間濃縮した後の、Db-gp100、Kb-SIINF、及びLd-A5ナノaAPC増殖の、代表的なFACSプロット。(図3E)示したナノaAPCで濃縮し、活性化した後の、抗原特異的細胞パーセント(左)及び抗原特異的細胞総数(右)の要約。(図3F)3つの抗原(Db-gp100、Kb-SIINF、Kb-Trp2)で同時に濃縮、増殖させた。各抗原に対する、同じT細胞培養物由来の抗原特異性の代表的なFACSプロット。(図3G

40

50

）個々にまたは一緒に濃縮しかつ増殖させた際の、示した3つの抗原に対して生成される抗原特異性（左）及び抗原特異的細胞総数（右）の比較。

【図4】濃縮しかつ増殖させたT細胞の養子移入は、腫瘍排除を仲介する。（図4A）養子移入後の増殖に対する、リンパ枯渇及びバスタンダー競合減少の影響。無関係なB6細胞が 10^6 個または 10^7 個のいずれかで存在する状態で 10^5 個のpme1 T細胞を養子移入する1日前に、B6マウスを、処置しないか、または500cGyガンマ照射でリンパ枯渇させた。リンパ枯渇、及びより少ないバスタンダー細胞の投与はどちらも、脾臓及びリンパ節から回収されるpme1 T細胞の頻度を増加させた（2元配置ANOVAによって、 $p < 0.01$ ）。（図4B）（図4A）で回収したThy1.1 + pme1細胞の総数。（図4C）養子移入の前に7日間培養したKb - Trp2及びDb - gp100濃縮 + 増殖リンパ球は、黒色腫増殖を阻害した（2元配置ANOVAによって、 $p < 0.01$ 、8匹のマウス/群）。マウスは、8日前に皮下に黒色腫を注射され、かつ1日前に500cGyガンマ照射で照射された。非同族の、濃縮しかつ増殖させたリンパ球（SINF）は、腫瘍増殖を阻害せず（未処置に比較して）、一方、同族の、濃縮しかつ増殖させたリンパ球（Trp2 + gp100）は、腫瘍増殖を阻害した。（図4D）（図4C）からの動物の生存。Kb - Trp2及びDb - gp100処置群において、2/8のマウスが腫瘍の完全な排除を示し、非同族及び未処置群と比較して、有意により長い生存であった（マンテル - コックスによって、 $p < 0.01$ ）。

10

【図5】ヒト抗腫瘍反応の増大。CD8 + PBMCを、健康なドナーから単離し、1週間の濃縮及び増殖プロトコルを用いて増殖させた。（図5A）CD8単離直後（第0日、左）、ならびに濃縮及び増殖1週間後（第7日、右）のA2 - NY - ES01（上部）及びA2 - MART1（下部）特異的細胞の代表的な染色及び頻度。（図5B）示したナノaAPCでの濃縮/増殖後の抗原特異的細胞頻度パーセント（上部）及び抗原特異的細胞総数（下部）の要約。異なるドナーを用いた3回の実験から得た結果。

20

【図6】ネオエピトープによる増殖。（図6A）B16及びCT26ミュータム（mutome）に関する候補ペプチドを生成するためのプロセスの模式図。一塩基対置換（SBS）部周囲の17mer配列を、MHCNet予測アルゴリズムによって、MHC結合に関して評価する。（図6B）同族（上部）及び非同族（下部）MHCに対するネオエピトープに対して、ナノaAPC E + Eで7日間増殖させた細胞の代表的な結合。（図6C）E + E 1週間後に得られる総ネオエピトープ特異的細胞。

30

【図7】マイクロaAPCは、抗原特異的濃縮に関して有効でない。（図7A）結合したビーズの蛍光標識によって特徴付けられる、マイクロ（上部）及びナノ（下部）aAPCの同族pME1（赤）または非同族2C（青）CD8 + T細胞への結合。ビーズ不含（灰色）バックグラウンドを対照として示す。（図7B）マイクロaAPCは、同族細胞を濃縮しない。Thy1.1 + pme1細胞を、ポリクローナルなThy1.2 + B6脾臓細胞と、1:1000の比でインキュベーションし、Db - GP100微粒子を用いて濃縮を試みた。Thy1.1 + 細胞の頻度は、濃縮後に有意に増加しなかった。（図7C）マイクロaAPCの増加する量を適用して図7Cにおけるように行った、抗原特異的細胞頻度及び回収された細胞のパーセント。

【発明を実施するための形態】

40

【0014】

発明の詳細な説明

養子免疫療法は、エキスピボでの免疫細胞の活性化及び増殖を伴い、生じた細胞を患者に移入して、疾患、例えば癌を治療する。例えば、養子移入による抗原特異的細胞傷害性（CD8 +）リンパ球（CTL）反応の導入は、十分な数及び頻度の、活性化された抗原特異的であるCTLが、稀な前駆体細胞由来のものを含めて比較的短期間で生成可能であるならば、魅力的な療法であり得る。このアプローチは、いくつかの実施形態において、疾患の再発を防止する長期記憶でさえ生成可能である。癌免疫療法、及びCTLを用いる免疫療法に加えて、本発明は、CD4 + T細胞及び制御性T細胞を含む他の免疫細胞にも使用を見出し、したがって、とりわけ、感染性疾患及び自己免疫疾患のための免疫療法

50

に広く適用可能である。

【0015】

1つの態様において、本発明は、免疫エフェクター細胞、例えば抗原特異的Tリンパ球、例えばCTLを捕捉し、かつこれらの細胞に刺激シグナルを送達する、人工的抗原提示細胞(aAPC)を提供する。いくつかの実施形態において、これらのaAPCは、養子免疫療法のための強力なツールを提供する。aAPC上に存在するT細胞活性化を支持するシグナルには、主要組織適合複合体(MHC)、クラスIまたはクラスIIの状態では提示され、かつ抗原特異的T細胞受容体(TCR)に結合する抗原性ペプチドであるシグナル1、及びT細胞反応を調節する1つ以上の共刺激リガンドであるシグナル2が含まれる。この系のいくつかの実施形態において、シグナル1は、単量体、二量体または多量体MHC構築物によって与えられる。二量体構築物は、いくつかの実施形態において、免疫グロブリン重鎖配列の可変領域またはC_H1領域の融合によって生成される。MHC複合体には、1つ以上の抗原性ペプチドが負荷され、シグナル2は、B7.1(T細胞受容体CD28の天然リガンド)またはCD28に対する活性化抗体のいずれかである。どちらのリガンドも、マイクロスケール(4.5 μm)またはナノスケールサイズの表面に直接、化学的にカップリングされて、人工的抗原提示細胞(aAPC)を生成することも可能である。いくつかの実施形態において、粒子材料は常磁性であり、磁場の適用によって磁気捕捉または「濃縮」を可能にし、それに続く濃縮細胞画分内での抗原特異的リンパ球の増殖を可能にし、これもまた磁場の適用によって増進される。他の実施形態において、常磁性特性は、ナイーブ細胞由来のものであっても、迅速なT細胞反応(例えば活性化)を支持し、こうした反応はインビトロで数分から数時間以内に検出可能である。

10

20

【0016】

いくつかの態様において、本発明は、養子移入のための抗原特異的T細胞集団を調製するための方法を提供する。本方法は、抗原特異的T細胞の養子移入の必要がある患者からT細胞を含む試料を提供することを含む。本明細書に詳細に記載するように、各々、MHC(クラスIまたはII)の状態に関心対象のペプチド抗原を提示しかつそれによって試料中の抗原特異的T細胞(稀にしか提示されないナイーブ抗原特異的細胞を含む)と結合する常磁性aAPC集団と、T細胞またはT細胞を含有する試料とを接触させる。aAPCは、関心対象の疾患(例えば腫瘍型)に共通の抗原を提示してもよいし、または個別化ベースで選択された1つ以上の抗原を提示してもよい。常磁性特性を利用して、例えば、非会合細胞からaAPC会合細胞を分離するために磁石を用いることによって、抗原特異的T細胞を捕捉するか、またはこうした細胞に関して試料を「濃縮」することも可能である。回収されたT細胞、例えば常磁性aAPC粒子と会合したままである細胞を、aAPCの存在下で、インビトロで増殖させてもよく、抗原特異的細胞の増殖をさらに、磁場の存在によって増進させる。理論によって束縛されることは望ましくないが、抗原特異的T細胞に結合した常磁性aAPCは、磁場の存在下で、T細胞受容体クラスター形成を促進するであろうと考えられる。増殖段階は、いくつかの実施形態において、約3日間~約2週間、または約5日間~約10日間(例えば約1週間)実行可能である。次いで、抗原特異的細胞の最適な増殖(及びさらなる純度)のため、濃縮及び増殖プロセスを1回以上、反復してもよい。濃縮及び増殖の続くラウンドのため、さらなるaAPCをT細胞に添加して、試料中のより多量の抗原特異的T細胞集団の増殖を支持することも可能である。特定の実施形態において、増殖の最終ラウンド(例えばラウンド2、3、4、または5)はインビボで行われ、ここで生体適合性ナノAPCを、増殖させたT細胞集団に添加し、次いで、患者内に注入する。

30

40

【0017】

特定の実施形態において、本方法は、抗原特異的T細胞の約1000~10,000倍(以上)の増殖を提供し、約10⁸個より多い抗原特異的T細胞が、例えば約1ヶ月未満、または約3週間未満、または約2週間未満、または約1週間のスパンで生成される。生じる細胞を患者に投与して疾患を治療することも可能である。いくつかの実施形態において、生じる抗原特異的T細胞集団と一緒に、aAPCを患者に投与してもよい。

50

【0018】

さらに他の態様において、本発明は、個別化ベースでT細胞抗原を選択するための方法を提供する。例えば特定の実施形態において、各々候補抗原性ペプチドを提示するaAPCのアレイまたはライブラリーを、対象または患者由来のT細胞で（いくつかの実施形態においては、磁場の存在下で）スクリーニングし、各aAPC-ペプチドに対するT細胞の反応を決定するかまたは定量化する。いくつかの実施形態において、例えば、サイトカイン発現またはT細胞活性化の他の代理マーカーの発現を定量化することによって（例えば、免疫化学反応、または発現された遺伝子のRT-PCRによるなどの増幅によって）、T細胞反応を分子的に定量化してもよい。いくつかの実施形態において、定量化する段階は、培養中に、約15時間～48時間の間で行う。他の実施形態において、T細胞反応は、細胞内シグナル伝達（例えばCa²⁺シグナル伝達、またはT細胞活性化中の初期に起こる他のシグナル伝達）を検出することによって決定され、したがって、ナノaAPCとの培養中、約15分間～約5時間（例えば約15分間～約2時間以内）で定量化可能である。最も口バスタな反応を示すペプチドを、いくつかの実施形態において、本明細書記載の養子免疫療法を含む免疫療法のために選択する。いくつかの実施形態において、特に癌免疫療法のため、患者の腫瘍を遺伝子分析して（例えば次世代配列決定を用いて）、患者のユニークな腫瘍突然変異シグネチャーから腫瘍抗原を予測する。これらの予測された抗原（「ネオ抗原」）を合成し、本明細書記載のaAPCプラットフォームを用いて、患者のT細胞に対してスクリーニングする。ひとたび反応性抗原を同定し/確認したら、本明細書に記載する濃縮及び増殖プロトコルのためにaAPCを調製することも可能であるし、またはいくつかの実施形態において、aAPCを患者に直接投与することも可能である。

10

20

【0019】

いくつかの態様において、対象または患者のT細胞を、各常磁性ナノaAPCがペプチド抗原を提示する、常磁性ナノaAPC（本明細書に記載する通り）のアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングする。各々に対するT細胞反応を、本明細書に記載するように決定するかまたは定量化し、患者のT細胞レパートリー、したがって、対象または患者の状態に関する有用な情報を提供する。

【0020】

例えば、突然変異タンパク質、過剰発現されたタンパク質、及び/または他の腫瘍関連抗原に対するT細胞抗腫瘍反応の数及び同一性をバイオマーカーとして用いて、リスクを層別化してもよく、いくつかの実施形態において、これは、薬剤耐性若しくは薬剤感受性に関する反応プロファイルを分類するか、または免疫療法（例えばチェックポイント阻害剤療法または養子T細胞移入療法）のための候補として反応プロファイルを層別化する、コンピュータ実装分類子アルゴリズムを伴うことも可能である。例えば、こうしたT細胞反応の数または強度は、疾患進行の高リスクに反比例することも可能であるし、及び/または免疫療法に対する患者のあり得る反応に直接関連することも可能であり、これには、チェックポイント阻害剤療法、養子T細胞移入、または癌のための他の免疫療法の1つ以上が含まれることも可能である。

30

【0021】

さらに他の態様及び実施形態において、患者のT細胞を、各々が候補ペプチド抗原を提示する、常磁性ナノaAPCのアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングする。例えば、アレイまたはライブラリーは、腫瘍関連抗原を提示してもよいし、または自己抗原を提示してもよいし、または多様な感染性疾患に関連するT細胞抗原を提示してもよい。アレイまたはライブラリーを患者T細胞とインキュベーションすることによって、かつT細胞受容体クラスター形成を進めるための磁場の存在下で、T細胞反応の存在、及び/またはこれらのT細胞反応の数若しくは強度を迅速に決定可能である。この情報は、例えば、無症候性腫瘍、自己免疫疾患若しくは免疫疾患、または感染性疾患の診断に有用であり、かつこれは、潜在的な病原性または療法性T細胞、T細胞抗原を含む、疾患生物学の最初の理解、及び薬剤または免疫療法ターゲットに相当する、関心対象のT細胞受容体の

40

50

理解を提供可能である。

【0022】

本発明の多様な態様の多様な代替実施形態を以下に詳細に記載する。

【0023】

本発明は、エキスピボでの抗原特異的免疫細胞の検出、濃縮及び/または増殖が、療法的にまたは診断的に望ましい、癌及び他の疾患のための免疫療法を提供する。本発明は、一般的に、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、ヘルパーT細胞、及び制御性T細胞を含む、抗原特異的T細胞の検出、濃縮及び/または増殖に適用可能である。

【0024】

いくつかの実施形態において、患者は癌患者である。患者への養子移入のためのエキスピボの抗原特異的CTLの濃縮及び増殖は、ロバストな抗腫瘍免疫反応を提供する。本方法に従って治療または評価され得る癌には、歴史的に、劣った免疫反応しか誘発しないかまたは高率の再発を有する癌が含まれる。例示的な癌には、癌腫、肉腫、及びリンパ腫を含む、多様なタイプの固形腫瘍が含まれる。多様な実施形態において、癌は、黒色腫（転移性黒色腫を含む）、結腸癌、十二指腸癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腺管癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮内膜癌、精巣癌、胃癌、異形成口腔粘膜、ポリープ症、頭頸部癌、侵襲性口腔癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫、移行細胞及び扁平細胞泌尿器癌（urinary carcinoma）、脳癌、神経芽腫、及び神経膠腫である。いくつかの実施形態において、癌は、血液学的悪性腫瘍、例えば慢性骨髄性白血病、小児期急性白血病、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、悪性皮膚T細胞、菌状息肉症、非MF皮膚T細胞リンパ腫、リンパ腫瘍丘疹症、T細胞リッチ皮膚リンパ過形成、及び円板状エリテマトーデスである。

10

20

【0025】

多様な実施形態において、癌は、ステージI、ステージII、ステージIII、またはステージIVである。いくつかの実施形態において、癌は転移性及び/または再発性である。いくつかの実施形態において、癌は発症前であり、かつ本明細書に記載するスクリーニング系において検出される（例えば結腸癌、膵臓癌、または早期検出が困難である他の癌）。

【0026】

いくつかの実施形態において、患者は感染性疾患を有する。感染性疾患は、患者への養子移入のための抗原特異的免疫細胞（例えばCD8+またはCD4+ T細胞）のエキスピボでの濃縮及び増殖が、生産的な免疫反応を増進するかまたは提供することも可能であるものであってもよい。治療可能な感染性疾患には、細菌、ウイルス、プリオン、真菌、寄生虫、蠕虫等によって引き起こされるものが含まれる。こうした疾患には、AIDS、肝炎、CMV感染、及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）が含まれる。例えば、CMVは臓器移植患者に見られる最も一般的なウイルス性病原体であり、かつ骨髄または末梢血幹細胞移植を経た患者において、罹患率及び死亡率の主因である。これは、これらの患者の免疫無防備状態によるものであり、これによって、血清陽性患者における不顕性ウイルスの再活性化、または血清陰性個体における日和見感染が可能になる。これらの治療に対する有用な代替法は、移植処置開始前の、患者に由来するまたは適切なドナーに由来するウイルス特異的CTLの生成を伴う予防的免疫療法措置である。PTLDは、移植患者のかなりの割合で起こり、エプスタイン-バーウイルス（EBV）感染から生じる。EBV感染は、米国において、成人集団のおよそ90%に存在すると考えられる。活性ウイルス複製及び感染は、免疫系によるチェックで維持されるが、CMVの場合のように、移植療法によって免疫無防備性となった個体は、調節性T細胞集団を失い、このためウイルス再活性化が可能になる。これは、移植プロトコルに対する深刻な障害に相当する。EBVはまた、多様な血液学的及び非血液学的癌における腫瘍促進にも関与し得る。

30

40

【0027】

いくつかの実施形態において、患者は、自己免疫疾患を有し、この場合、患者への養子移入のための制御性T細胞（例えばCD4+、CD25+、Foxp3+）のエキスピボ

50

での濃縮及び増殖は、有害な免疫反応を弱め得る。治療可能な自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、I型糖尿病、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、重症筋無力症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、尋常性天疱瘡、アジソン病、疱疹状皮膚炎、セリアック病、及び橋本甲状腺炎が含まれる。いくつかの実施形態において、患者は、自己免疫疾患または免疫状態（例えば前文に記載するもの）を有することが疑われ、本明細書に記載するような常磁性ナノaAPCのライブラリーに対するT細胞反応の評価は、免疫状態を同定するかまたは確認するために有用である。

【0028】

したがって、多様な実施形態において、本発明は、抗原特異性T細胞、例えば細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、ヘルパーT細胞、または制御性T細胞の濃縮及び増殖を含む。いくつかの実施形態において、本発明は抗原特異的CTLの濃縮及び増殖を含む。前駆体T細胞は、患者から、またはHLAが適合する適切なドナーから得られ得る。前駆体T細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髓、リンパ節組織、脾臓組織、及び腫瘍を含む、多くの供給源から得られ得る。いくつかの実施形態において、試料は患者由来のPBMC試料である。いくつかの態様において、PBMC試料を用いて、関心対象のT細胞集団、例えばCD8+、CD4+または制御性T細胞を単離する。いくつかの実施形態において、前駆体T細胞は、当業者に知られる任意の多くの技術、例えばFicoll分離法により、対象から収集される血液部分から得られる。例えば、個体の循環血液由来の前駆体T細胞は、アフレーシスまたは白血球取り出しによって得られ得る。アフレーシス産物は、典型的には、T細胞及び前駆体T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含有する。白血球取り出しは、白血球を血液試料から分離する、実験室処置である。

10

20

【0029】

アフレーシスによって収集された細胞を洗浄して、血漿画分を除去し、続くプロセッシング段階のため、細胞を適切な緩衝液または培地に入れてもよい。当業者に知られる方法によって、例えば製造者の指示に従って、半自動「フロースルー」遠心分離（例えばCobe 2991細胞プロセッサ）を用いることによって、洗浄する段階を達成してもよい。洗浄後、細胞を多様な生体適合性緩衝液、例えばCa不含、Mg不含PBS中に再懸濁してもよい。あるいは、アフレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培地に直接再懸濁してもよい。

30

【0030】

望ましい場合、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL（商標）勾配によって遠心分離することにより単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から前駆体T細胞を単離してもよい。

【0031】

望ましい場合、存在し得る他の細胞から、T細胞の下位集団を分離してもよい。例えば、T細胞の特定の下位集団、例えばCD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、及びCD45RO+ T細胞を、陽性または陰性選択技術によってさらに単離することも可能である。他の濃縮技術には、例えば細胞上に存在する陰性選択される細胞表面マーカーに対して向けられるモノクローナル抗体のカクテルを用いた、陰性磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによる細胞ソーティング及び/または選択が含まれる。

40

【0032】

特定の実施形態において、白血球取り出しによって白血球を収集し、続いて、既知の方法、例えば商業的に入手可能な磁気濃縮カラムを用いて、CD8+ T細胞に関して濃縮する。次いで、aAPC試薬とともに磁気濃縮を用いて、CD8濃縮細胞を抗原特異的T細胞に関して濃縮する。多様な実施形態において、少なくとも約 10^5 個、または少なくとも約 10^6 個、または少なくとも約 10^7 個のCD8濃縮細胞を、抗原特異的T細胞濃縮のために単離する。

【0033】

多様な実施形態において、免疫細胞（例えばCD8+ T細胞）を含む試料を、磁気特

50

性を有する人工的抗原提示細胞 (a A P C) と接触させる。常磁性物質は、磁場に対して小さい陽性感受性を有する。これらの物質は磁場に誘引され、かつこれらの物質は外部の磁場が取り除かれた際、磁性特性を保持しない。例示的な常磁性物質には、限定なしに、マグネシウム、モリブデン、リチウム、タンタル、及び酸化鉄が含まれる。磁性濃縮に適した常磁性ビーズは商業的に入手可能である (D Y N A B E A D S (商標) 、 M A C S M I C R O B E A D S (商標) 、 M i l t e n y i B i o t e c) 。いくつかの実施形態において、 a A P C 粒子は、鉄デキストランビーズ (例えばデキストランコーティングされた酸化鉄ビーズ) である。

【 0 0 3 4 】

特定の実施形態において、 a A P C は少なくとも 2 つのリガンド、抗原提示複合体 (ペプチド - M H C) 、及びリンパ球活性化リガンドを含有する。

10

【 0 0 3 5 】

抗原提示複合体は、 T 細胞または T 細胞前駆体に対して提示するための抗原を収容する抗原結合溝部を含む。抗原提示複合体は、例えば M H C クラス I またはクラス I I 分子であってもよく、二量体または多量体 M H C を提供するように連結されるかまたは繋がれることも可能である。いくつかの実施形態において、 M H C は単量体であるが、アビディティ及び活性化には、ナノ粒子上の緊密な会合で十分である。いくつかの実施形態において、 M H C は二量体である。二量体 M H C クラス I 構築物を免疫グロブリン重鎖配列への融合によって構築してもよく、これらは次いで、 1 つ以上のジスルフィド結合によって (かつ結合した軽鎖を伴って) 結合する。いくつかの実施形態において、シグナル 1 複合体は、非古典的 M H C 様分子、例えば C D 1 ファミリーのメンバー (例えば C D 1 a 、 C D 1 b 、 C D 1 c 、 C D 1 d 、及び C D 1 e) である。 M H C 多量体は、ペプチドまたは化学的リンカーを介して直接繋ぐことによって生成されてもよいし、またはビオチン部分を介したストレプトアビジンとの会合によって多量体にすることも可能である。いくつかの実施形態において、抗原提示複合体は、免疫グロブリン配列との融合を伴う、 M H C クラス I または M H C クラス I I 分子複合体であり、これは、免疫グロブリン主鎖によって提供される安定性及び分泌効率に基づいて、非常に安定でありかつ産生するのが容易である。

20

【 0 0 3 6 】

免疫グロブリン配列を有する M H C クラス I 分子複合体は、米国特許第 6 , 2 6 8 , 4 1 1 号に記載され、該特許はその全体が本明細書に援用される。これらの M H C クラス I 分子複合体は、免疫グロブリン重鎖の端で、コンホメーション的に損なわれていない (i n t a c t) 様式で形成され得る。抗原性ペプチドが結合する M H C クラス I 分子複合体は、抗原特異的リンパ球受容体 (例えば T 細胞受容体) に安定して結合可能である。多様な実施形態において、免疫グロブリン重鎖配列は全長ではないが、 I g ヒンジ領域、ならびに C H 1 、 C H 2 、及び / または C H 3 ドメインの 1 つ以上を含む。 I g 配列は、可変領域を含んでもまたは含まなくてもよいが、可変領域配列が存在する場合、可変領域は、全長または部分的であってもよい。複合体は、さらに免疫グロブリン軽鎖を含んでもよい。

30

【 0 0 3 7 】

例示的な M H C クラス I 分子複合体は、少なくとも 2 つの融合タンパク質を含む。第 1 の融合タンパク質は、第 1 の M H C クラス I 鎖及び第 1 の免疫グロブリン重鎖 (またはヒンジ領域を含むその一部) を含み、第 2 の融合タンパク質は、第 2 の M H C クラス I 鎖及び第 2 の免疫グロブリン重鎖 (またはヒンジ領域を含むその一部) を含む。第 1 及び第 2 の免疫グロブリン重鎖は会合して、 M H C クラス I 分子複合体を形成し、該複合体は、 2 つの M H C クラス I ペプチド結合溝部を含む。免疫グロブリン重鎖は、 I g M 、 I g D 、 I g G 1 、 I g G 3 、 I g G 2 、 I g G 2 、 I g G 4 、 I g E 、または I g A の重鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、 I g G 重鎖を用いて、 M H C クラス I 分子複合体を形成する。多価 M H C クラス I 分子複合体が望ましい場合、 I g M または I g A 重鎖を用いて、それぞれ、五価または四価分子を提供してもよい。

40

【 0 0 3 8 】

50

例示的なクラス I 分子には、HLA - A、HLA - B、HLA - C、HLA - E が含まれ、これらを個々に、または任意の組み合わせで使用してもよい。いくつかの実施形態において、抗原提示複合体は、HLA - A 2 リガンドである。

【0039】

例示的な MHC クラス II 分子複合体は、米国特許第 6,458,354 号、米国特許第 6,015,884 号、米国特許第 6,140,113 号、及び米国特許第 6,448,071 号に記載され、これらの特許はその全体が本明細書に援用される。MHC クラス II 分子複合体は、少なくとも 4 つの融合タンパク質を含む。2 つの第 1 の融合タンパク質は、(i) 免疫グロブリン重鎖（またはヒンジ領域を含むその一部）及び (ii) MHC クラス II 鎖の細胞外ドメインを含む。2 つの第 2 の融合タンパク質は、(i) 免疫グロブリン または 軽鎖（またはその一部）及び (ii) MHC クラス II 鎖の細胞外ドメインを含む。2 つの第 1 の及び 2 つの第 2 の融合タンパク質が会合して、MHC クラス II 分子複合体を形成する。第 1 の融合タンパク質各々の MHC クラス II 鎖の細胞外ドメイン及び第 2 の融合タンパク質各々の MHC クラス II 鎖の細胞外ドメインは、MHC クラス II ペプチド結合溝部を形成する。

10

【0040】

免疫グロブリン重鎖は、IgM、IgD、IgG3、IgG1、IgG2、IgG2、IgG4、IgE、または IgA の重鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、IgG1 重鎖を用いて、2 つの抗原結合溝部を含む、二価分子複合体を形成する。任意で重鎖可変領域が含まれてもよい。IgM または IgA 重鎖を用いて、それぞれ、五価または四価分子複合体を提供してもよい。

20

【0041】

MHC クラス II 分子複合体の融合タンパク質は、免疫グロブリン鎖及び MHC クラス II ポリペプチドの細胞外ドメインの間に挿入されたペプチドリンカーを含んでもよい。リンカー配列の長さは、抗原結合及び受容体架橋の度合いを制御するために必要な柔軟性に応じて、多様であってもよい。

【0042】

免疫グロブリン配列は、いくつかの実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体配列である。

【0043】

シグナル 2 は、一般的に、T 細胞に影響を及ぼす分子であり、すなわち前駆体 T 細胞に、または抗原特異的 T 細胞に対する生物学的影響を有する分子である。こうした生物学的影響には、例えば、前駆体 T 細胞の、CTL、ヘルパー T 細胞（例えば Th1、Th2）、または制御性 T 細胞への分化、及び / または T 細胞の増殖が含まれる。したがって、T 細胞に影響を及ぼす分子には、T 細胞共刺激分子、接着分子、T 細胞増殖因子、及び制御性 T 細胞誘導分子が含まれる。いくつかの実施形態において、aAPC は少なくとも 1 つのこうしたリガンドを含み、任意で aAPC は少なくとも 2 つ、3 つ、または 4 つのこうしたリガンドを含む。

30

【0044】

特定の実施形態において、シグナル 2 は、T 細胞共刺激分子である。T 細胞共刺激分子は、抗原特異的 T 細胞の活性化に寄与する。こうした分子には、限定されるわけではないが、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、B7-H3、4-1BB、4-1BBL、CD27、CD30、CD134 (OX-40L)、B7h (B7RP-1)、CD40、LIGHT に特異的に結合する分子（抗体を含む）、HVEM に特異的に結合する抗体、CD40L に特異的に結合する抗体、OX40 に特異的に結合する抗体、及び 4-1BB に特異的に結合する抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、共刺激分子（シグナル 2）は、抗体（例えばモノクローナル抗体）またはその一部、例えば F(ab')₂、Fab、scFv、または一本鎖抗体、または他の抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体はヒト化モノクローナル抗体若しくは抗原結合活性を有するその一部であるか、または完全ヒト抗体若しくは抗原結合活性を有するその部

40

50

分である。

【0045】

ナノaAPCに有用な接着分子を用いて、ナノaAPCのT細胞へのまたはT細胞前駆体への接着を仲介してもよい。有用な接着分子には、例えば、ICAM-1及びLFA-3が含まれる。

【0046】

いくつかの実施形態において、シグナル1は、ペプチド-HLA-A2複合体によって提供され、シグナル2は、B7.1-Igまたは抗CD28によって提供される。例示的な抗CD28モノクローナル抗体は、9.3 mAb (Tanら, J. Exp. Med. 1993 177:165)であり、該抗体は、特定の実施形態においてヒト化され、及び/または損なわれていない完全な抗体またはその抗原結合断片として、ビーズにコンジュゲートされてもよい。

10

【0047】

いくつかの実施形態は、T細胞増殖因子を使用し、該因子は、T細胞の増殖及び/または分化に影響を及ぼす。T細胞増殖因子の例には、サイトカイン(例えばインターロイキン、インターフェロン)及びスーパー抗原が含まれる。望ましい場合、融合タンパク質を含む分子複合体中にサイトカインが存在してもよく、またはaAPCによって被包されていてもよい。特に有用なサイトカインには、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21ガンインターフェロン、及びCXCL10が含まれる。任意で、サイトカインは、増殖段階中に、培地成分によって単独で提供される。

20

【0048】

ナノ粒子は、任意の材料で作製されていてもよく、材料は、望ましい磁性特性に関して適切に選択されてもよく、例えば、金属、例えば鉄、ニッケル、コバルト、または希土類金属の合金を含んでもよい。常磁性材料にはまた、マグネシウム、モリブデン、リチウム、タンタル、及び酸化鉄も含まれてもよい。物質(細胞を含む)の濃縮に適した常磁性ビーズが商業的に入手可能であり、これには鉄デキストランビーズ、例えばデキストランコーティングされた酸化鉄ビーズが含まれる。磁性特性が必要でない本発明の態様において、ナノ粒子はまた、非金属または有機(例えばポリマー性)材料、例えばセルロース、セラミックス、ガラス、ナイロン、ポリスチレン、ゴム、プラスチック、またはラテックスで作製されてもよい。ナノ粒子を調製するための例示的な材料には、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)及びそのコポリマーがあり、該材料をこれらの実施形態と組み合わせて使用してもよい。使用可能なポリマー及びコポリマーを含む他の材料には、本明細書にその全体が援用される、PCT/US2014/25889に記載されるものが含まれる。

30

【0049】

いくつかの実施形態において、磁気粒子は生体適合性である。これは、aAPCが、濃縮しかつ増殖させた細胞と会合して患者に送達される実施形態において特に重要である。例えば、いくつかの実施形態において、磁気粒子は、生体適合性鉄デキストラン常磁性ビーズである。

【0050】

多様な実施形態において、粒子は、約10~約500nm、または約20~約200nm内のサイズ(例えば平均直径)を有する。特に、aAPCを患者に送達する実施形態において、マイクロスケールaAPCはリンパ管によって運ぶには大きすぎ、皮下注射した際は注射部位に留まる。静脈内注射すると、これらは毛細血管床に留まる。実際、マイクロスケールのビーズの劣った輸送は、aAPCが最適免疫療法のため輸送されるべきである場合の研究を妨げてきた。ナノaAPCの輸送及び生体分布は、マイクロスケールaAPCよりもより効率的であるようである。例えば、aAPCが最も有効である2つの潜在的な部位は、ナイーブ及び記憶T細胞が常在するリンパ節、ならびに腫瘍自体である。約50~約200nm直径のナノ粒子は、リンパ管に取り込まれ、リンパ節に輸送され、したがって、T細胞のより大きなプールへのアクセスを獲得し得る。本明細書に援用される

40

50

PCT/US2014/25889に記載されるように、ナノaAPCの皮下注射は、対照または静脈内注射ビーズよりも、より少ない腫瘍増殖を生じた。

【0051】

いくつかの実施形態において、T細胞を患者に注入する直前にナノサイズのaAPCを用いて抗原特異的T細胞を再濃縮すると、例えば、マイクロサイズのaAPCを細胞とともに患者に注入する場合の影響であり得る、静脈及び動脈の閉塞を回避するであろう。

【0052】

細胞-ナノ粒子界面での受容体-リガンド相互作用は、よく理解されていない。しかし、ナノ粒子結合及び細胞活性化は、膜空間構造に影響されやすく、これは特に、T細胞活性化中に重要であって、磁場を用いて、クラスター結合ナノ粒子を操作して、活性化を増進させることも可能である。WO/2014/150132を参照されたい。例えば、T細胞活性化は、持続的に増進されるナノスケールTCRクラスター形成の状態を誘導し、ナノ粒子は、より大きい粒子が影響されにくい方式で、このクラスター形成の影響を受けやすい。WO/2014/150132を参照されたい。

10

【0053】

さらに、TCRクラスターとナノ粒子の相互作用を利用して、受容体誘発を増進することも可能である。T細胞活性化は、シグナル伝達タンパク質の凝集によって仲介され、数百ナノメートルに渡る「シグナル伝達クラスター」が、T細胞-APC接触部位の周辺に最初に形成され、内側に移動する。本明細書に記載するように、外部磁場を用いて、抗原特異的T細胞（稀なナイーブ細胞を含む）を濃縮し、TCRに結合した磁気ナノaAPCの凝集を行わせて、TCRクラスターの凝集及びナイーブT細胞の活性化増進を生じることが可能である。磁場は常磁性粒子に対して、適切に強い力を発揮し得るが、それ以外では生物学的に不活性であり、このため、粒子の振る舞いを調節する強力なツールとなっている。常磁性ナノaAPCに結合したT細胞は、外部適用される磁場の存在下で活性化される。ナノaAPCはそれ自体磁化され、磁場供給源及び磁場中の近傍のナノ粒子の両方に付着し、ビーズ及びしたがってTCR凝集を誘導して、aAPC仲介活性化をブーストする。WO/2014/150132を参照されたい。

20

【0054】

ナノaAPCは、より多くのTCRに結合し、かつナイーブT細胞に比較して、以前活性化されたものより大きな活性化を誘導する。さらに、外部磁場を適用すると、ナイーブ細胞上のナノaAPC凝集が誘導され、インビトロで、かつその後のインビボ養子移入での両方で、T細胞増殖を増進する。重要なことに、黒色腫瘍免疫療法モデルにおいて、磁場中でナノaAPCによって活性化されたT細胞は、腫瘍排除を仲介する。したがって、適用された磁場を用いると、そうでなければ刺激に対して不十分にしか反応しない、ナイーブT細胞集団の活性化が可能になる。ナイーブT細胞は、癌免疫療法に関して、より分化したサブタイプよりもより有効であることが示されてきているため、これは重要な特徴であり、高い増殖能及び長期の強いT細胞反応を生成する能力を伴う。したがって、ナノaAPCをT細胞の磁場増進活性化に用いて、ナイーブ前駆体から増殖させた抗原特異的T細胞の収量及び活性を増加させて、例えば感染性疾患、癌、若しくは自己免疫疾患を有する患者のための細胞療法を改善するか、または免疫抑制患者に対する予防的保護を提供することも可能である。

30

40

【0055】

吸着によって、または共有結合を含む直接化学結合によって、分子を直接、ナノ粒子に付着させることも可能である。Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York, 1996を参照されたい。求核基、脱離基、または求電子基を含む、多様な化学的官能性で、分子自体を直接活性化してもよい。活性化官能基には、ハロゲン化アルキル及びアシル、アミン、スルフィドリル、アルデヒド、不飽和結合、ヒドラジド、イソシアネート、イソチオシアネート、ケトン、及び化学結合を活性化することが知られる他の基が含まれる。あるいは、小分子カップリング試薬の使用によって、分子をナノ粒子に結合させてもよい。カップリン

50

グ試薬の限定されない例には、カルボジイミド、マレイミド、n-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ビスクロロエチルアミン、二官能性アルデヒド、例えばグルタルアルデヒド、無水物等が含まれる。他の実施形態において、アフィニティ結合、例えば当該技術分野に周知であるようなビオチン-ストレプトアビジン連結またはカップリングによって、分子をナノ粒子にカップリングしてもよい。例えば、共有または非共有結合によって、ストレプトアビジンをナノ粒子に結合させてもよいし、当該技術分野に周知の方法を用いて、ビオチン化分子を合成してもよい。

【0056】

ナノ粒子への共有結合を意図する場合、典型的にはリンカーを介して、適切な反応物質への共有結合に利用可能な、1つ以上の化学部分または官能基を含有するポリマーで支持体をコーティングしてもよい。例えば、アミノ酸ポリマーは、適切なリンカーを介して、共有結合的に分子にカップリングするために利用可能である基、例えばリジンのアミノ基を有してもよい。本開示はまた、ナノ粒子上に第2のコーティングを施し、これらの官能基を提供することも意図する。

10

【0057】

活性化化学反応を用いて、ナノ粒子表面への分子の特異的で安定な付着を可能にしてもよい。官能基にタンパク質を付着させるために使用可能な多くの方法がある。例えば、一般的な架橋グルタルアルデヒドを用いて、二ステッププロセスで、アミン化ナノ粒子表面にタンパク質アミノ基を付着させてもよい。生じる連結は、加水分解に対して安定である。他の方法には、タンパク質上のアミンと反応するn-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルを含有する架橋剤、アミン、スルフィドリル、またはヒスチジン含有タンパク質と反応する活性ハロゲン含有する架橋剤、アミンまたはスルフィドリル基と反応するエポキシド含有する架橋剤、マレイミド基及びスルフィドリル基の間のコンジュゲート、ならびにペンダント糖部分の過ヨウ素酸酸化後の還元アミン化によるタンパク質アルデヒド基の形成の使用が含まれる。

20

【0058】

同じナノ粒子上の特定のリガンドの比は、抗原または共刺激リガンド提示におけるナノ粒子有効性を増加させるために多様であってもよい。例えば、ナノ粒子を、多様な比、例えば約30:1、約25:1、約20:1、約15:1、約10:1、約5:1、約3:1、約2:1、約1:1、約0.5:1、約0.3:1、約0.2:1、約0.1:1、または約0.03:1のHLA-A2-Ig及び抗CD28とカップリングさせてもよい。支持体にカップリングさせるタンパク質の総量は、例えば粒子あたり約250mg/ml、約200mg/ml、約150mg/ml、約100mg/ml、または約50mg/mlであってもよい。サイトカイン放出及び増殖などのエフェクター機能は、シグナル1対シグナル2に関して、T細胞活性化及び分化とは異なる要求を有し得るため、これらの機能を別個に決定してもよい。

30

【0059】

ナノ粒子の立体配置は、不規則な形状から球状まで、及び/または不均一若しくは不規則な表面を有するものから平滑な表面を有するものまで、多様であることも可能である。非球体aAPCは、本明細書にその全体が援用されるWO 2013/086500に記載される。

40

【0060】

aAPCは、T細胞に抗原を提示し、したがって、これを用いて、ナイーブT細胞由来のものを含む抗原特異的T細胞の、濃縮および増殖の両方が可能である。ペプチド抗原は、望ましい療法、例えば、癌、癌のタイプ、感染性疾患等に基づいて、選択されるであろう。いくつかの実施形態において、本方法は、癌患者を治療するために行われ、患者に特異的なネオ抗原が同定され、aAPCに負荷するために合成される。いくつかの実施形態において、腫瘍の遺伝子分析(例えば核酸配列決定)後、予測バイオインフォマティクスによって、3~10種のネオ抗原を同定する。本明細書に示すように、本方法における機能性の損失をまったく伴わずに、いくつかの抗原を(別個のaAPC上で)一緒に使用する

50

ことも可能である。いくつかの実施形態において、抗原は、天然非突然変異癌抗原であり、こうしたものは多く知られる。個別化ベースで抗原を同定するためのこのプロセスを、以下により詳細に記載する。

【0061】

多様な抗原を抗原提示複合体に結合させてもよい。抗原の性質は、用いる抗原提示複合体のタイプに応じる。例えば、ペプチド抗原をMHCクラスI及びクラスIIペプチド結合溝部に結合させてもよい。非古典的MHC様分子を用いて、リン脂質、複合炭水化物等（例えば細菌膜成分、例えばミコール酸及びリポアラビノマンナン）を提示してもよい。免疫反応を誘導可能な任意のペプチドを、抗原提示複合体に結合させてもよい。抗原性ペプチドには、腫瘍関連抗原、自己抗原、同種抗原、及び感染性病原体の抗原が含まれる。

10

【0062】

「腫瘍関連抗原」には、由来する腫瘍によってもっぱら発現されるユニークな腫瘍抗原、多くの腫瘍において発現されるが、正常成人組織においては発現されない共通の腫瘍抗原（癌胎児性抗原）、及び腫瘍が発生した正常組織によってもまた発現される組織特異的抗原が含まれる。腫瘍関連抗原は、例えば、胚性抗原、異常な翻訳後修飾を含む抗原、分化抗原、突然変異癌遺伝子または腫瘍抑制因子の産物、融合タンパク質、または癌ウイルスタンパク質であってもよい。

【0063】

多様な腫瘍関連抗原が当該技術分野に知られており、かつこれらの多くは商業的に入手可能である。癌胎児性及び胚性抗原には、癌胚性抗原及びアルファ-フェトプロテイン（通常、発生中の胚においてのみ高発現されるが、しばしば、それぞれ肝臓及び結腸の腫瘍によっても高発現される）、MAGE-1及びMAGE-3（黒色腫、乳癌、及び神経膠腫において発現される）、胎盤アルカリホスファターゼ・シアリル-ルイスX（腺癌において発現される）、CA-125及びCA-19（胃腸、肝臓及び婦人科腫瘍において発現される）、TAG-72（結腸直腸腫瘍において発現される）、上皮糖タンパク質2（多くの癌腫において発現される）、膵臓癌胎児性抗原、5T4（胃癌において発現される）、アルファフェトプロテイン受容体（多数の腫瘍タイプ、特に乳房腫瘍において発現される）、及びM2A（生殖細胞新生物において発現される）が含まれる。

20

【0064】

腫瘍関連分化抗原には、チロシナーゼ（黒色腫において発現される）及び特定の表面免疫グロブリン（リンパ腫において発現される）が含まれる。

30

【0065】

突然変異癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子産物には、Ras及びp53が含まれ、これらはどちらも多くの腫瘍タイプにおいて発現され、Her-2/neu（乳癌及び婦人科学的癌において発現される）、EGF-R、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、網膜芽細胞腫遺伝子産物、myc（肺癌と関連）、ras、p53、乳房腫瘍と関連する非突然変異体、MAGE-1、及びMAGE-3（黒色腫、肺、及び他の癌と関連）が含まれる。融合タンパク質には、慢性骨髄性白血病において発現されるBCR-ABLが含まれる。癌ウイルスタンパク質には、子宮頸癌で見出されるHPV 16型、E6、及びE7が含まれる。

40

【0066】

組織特異的抗原には、メラノトランスフェリン及びMUC1（膵臓癌及び乳癌において発現される）、CD10（以前、共通急性リンパ芽球性白血球抗原、またはCALLAとして知られた）または表面免疫グロブリン（B細胞白血病及びリンパ腫において発現される）、IL-2受容体の鎖、T細胞受容体、CD45R、CD4+/CD8+（T細胞白血病及びリンパ腫において発現される）、前立腺特異的抗原及び前立腺酸ホスファターゼ（前立腺癌において発現される）、GP100、MelanA/Mart-1、チロシナーゼ、gp75/ブラウン、BAGE、及びS-100（黒色腫において発現される）、サイトケラチン（多様な癌において発現される）、ならびにCD19、CD20、及びCD37（リンパ腫において発現される）が含まれる。

50

【0067】

腫瘍関連抗原にはまた、改変糖脂質及び糖タンパク質抗原、例えばノイラミン酸含有糖スフィンゴ脂質（例えば、GM2及びGD2、黒色腫及びいくつかの脳腫瘍において発現される）、血液群抗原、特に癌において異常発現され得るT及びシアリルTn抗原、ならびにムチン、例えばCA-125及びCA-19-9（卵巣癌上で発現される）または過少グリコシル化MUC-1（乳癌及び膵臓癌上で発現される）も含まれる。

【0068】

「感染性病原体の抗原」には、原生動物、細菌、真菌（単細胞及び多細胞両方）、ウイルス、プリオン、細胞内寄生虫、蠕虫、及び免疫反応を誘導可能な他の感染性病原体が含まれる。

10

【0069】

細菌抗原には、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性細菌、嫌気性細菌、例えばアクチノミセス科（Actinomycetaceae）、バチルス科（Bacillaceae）、バルトネラ科（Bartonellaceae）、ボルデテラ科（Bordetellae）、カプトファガス科（Captophagaceae）、コリネバクテリウム科（Corynebacteriaceae）、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）、レジオネラ科（Legionellaceae）、ミクロコッカス科（Micrococcaceae）、ミコバクテリウム科（Mycobacteriaceae）、ノカルジア科（Nocardiaceae）、パストレラ科（Pasteurellaceae）、シュードモナス科（Pseudomonadaceae）、スピロヘータ科（Spirochaetaceae）、ビブリオ科（Vibrionaceae）の生物、ならびにアシネトバクター属（Acinetobacter）、ブルセラ属（Brucella）、カンピロバクター属（Campylobacter）、エリシペロトリクス属（Erysipelothrix）、エウイングセラ属（Ewingella）、フランシセラ属（Francisella）、ガードネラ属（Gardnerella）、ヘリコバクター属（Helicobacter）、レビネア属（Levinea）、リステリア属（Listeria）、ストレプトバチルス属（Streptobacillus）及びトロフェリマ属（Tropheryma）が含まれる。

20

【0070】

原生動物感染性病原体の抗原には、マラリア原虫、リーシュマニア属（Leishmania）種、トリパノゾーマ属（Trypanosoma）種及び住血吸虫属（Schistosoma）種が含まれる。

30

【0071】

真菌抗原には、アスペルギルス属（Aspergillus）、ブラストミセス属（Blasatomyces）、カンジダ属（Candida）、コクシオイデス属（Coccidioides）、クリプトコッカス属（Cryptococcus）、ヒストプラズマ属（Histoplasma）、パラコクシオイデス属（Paracoccidioides）、スポロトリクス属（Sporothrix）、ケカビ目（Mucorales）の生物、黒色真菌腫及び菌腫を誘導する生物、ならびに白癬菌属（Trichophyton）、ミクロスポルム属（Microsporium）、エピデルモフィトン属（Epidermophyton）、及びマラセチア属（Malassezia）の生物の抗原が含まれる。

40

【0072】

ウイルスペプチド抗原には、限定されるわけではないが、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ボックスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、及びCMVのものが含まれる。特に有用なウイルスペプチド抗原には、HIVタンパク質、例えばHIV gagタンパク質（限定されるわけではないが、膜係留（MA）タンパク質、コアカプシド（CA）タンパク質及びヌクレオカプシド（NC）タンパク質が含まれる）、HIVポリメラーゼ、インフルエンザウイルスマトリックス（M）タンパク質及びインフルエンザウイルスヌクレオカプシド（NP）タンパク

50

質、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎コアタンパク質(HBcAg)、肝炎eタンパク質(HBeAg)、B型肝炎DNAポリメラーゼ、C型肝炎抗原等が含まれる。

【0073】

抗原性ペプチドを含む抗原を、本明細書にその全体が援用される米国特許第6,268,411号に記載されるように、能動的にまたは受動的に、のいずれかで、抗原提示複合体の抗原結合溝部に結合させてもよい。任意で、抗原性ペプチドをペプチド結合溝部に共有結合させてもよい。

【0074】

望ましい場合、ペプチドを繋ぐことにより、ペプチド結合溝部に抗原性ペプチドを連結させてもよい。例えば、多数のクラスI MHC分子の結晶学的分析は、2Mのアミノ末端が、MHC-ペプチド結合溝部中に常在する抗原性ペプチドのカルボキシル末端から、およそ20.5オングストロームと非常に近いことを示す。したがって、長さおよそ13アミノ酸の比較的短いリンカー配列を用いて、2Mのアミノ末端にペプチドを繋ぐことも可能である。配列が適切である場合、そのペプチドはMHC結合溝に結合するであろう(米国特許第6,268,411号を参照されたい)。

10

【0075】

磁気濃縮または他の細胞ソーティング若しくは捕捉技術を用いて、結合していない細胞から、aAPCに結合した抗原特異的T細胞を分離してもよい。この目的のために使用可能な他のプロセスには、フローサイトメトリー及び他のクロマトグラフィ手段(例えば抗原提示複合体または本明細書に記載の他のリガンドの固定を伴う)が含まれる。1つの実施形態において、抗原特異的T細胞を、ビーズ、例えば抗原提示複合体/抗CD28コンジュゲート常磁性ビーズ(例えばDYNABEADS(登録商標))と、望ましい抗原特異的T細胞の陽性選択に十分な期間、インキュベーションすることによって単離する(または濃縮する)。

20

【0076】

いくつかの実施形態において、例えばCD44に対する抗体を用いて、T細胞集団の以前活性であったT細胞を実質的に枯渇させて、ナイーブT細胞が濃縮された集団を残すことも可能である。この集団へのナノaAPCの結合は、ナイーブT細胞を実質的に活性化させないが、その精製を可能にする。

【0077】

さらに他の実施形態において、NK細胞、NKT細胞、またはB細胞(または他の免疫エフェクター細胞)をターゲットとするリガンドを、常磁性ナノ粒子内に取り込んで、かつこれらの細胞集団に関して磁氣的に濃縮して、任意で、以下に記載するように培養下で増殖させるために用いることも可能である。さらなる免疫エフェクター細胞リガンドは、その全体が本明細書に援用されるPCT/US2014/25889に記載される。

30

【0078】

理論によって束縛されることは望ましくないが、望ましくない細胞を除去すると、サイトカイン及び増殖シグナルに関する競合が減少し、抑制細胞が除去されることも可能であるし、または単純に、関心対象の細胞を増殖させるためのより多くの物理的空間が提供され得る。

40

【0079】

次いで、磁場を生じるための磁石に近接させて培養下で濃縮T細胞を増殖させ、aAPC結合細胞のT細胞受容体クラスター形成を増進させる。培養を、多様な時間(例えば約0.5、2、6、12、36、48、または72時間、ならびに連続刺激)、ナノaAPCで刺激してもよい。非常に濃縮された抗原特異的T細胞培養において、刺激時間の効果を評価してもよい。抗原特異的T細胞を、培養液に戻し、当該技術分野に知られるように、細胞増殖、増殖速度、多様なエフェクター機能等に関して分析してもよい。こうした条件は、望ましい抗原特異的T細胞反応に応じて多様であり得る。いくつかの実施形態において、T細胞を約2日間~約3週間、またはいくつかの実施形態において、約5日間~約2週間、または約5日間~約10日間、培養下で増殖させる。いくつかの実施形態におい

50

て、T細胞を約1週間、培養下で増殖させ、その後、第2の濃縮及び増殖段階を任意で行う。いくつかの実施形態において、2、3、4、または5回の濃縮及び増殖ラウンドを行う。

【0080】

1回以上の濃縮及び増殖のラウンド後、試料の抗原特異的T細胞成分は、細胞の少なくとも約1%、またはいくつかの実施形態において、試料中の細胞の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%であろう。さらに、これらのT細胞は、一般的に、活性化状態を示す。患者から単離された元来の試料から、多様な実施形態において、抗原特異的T細胞を、約100倍～約10,000倍、例えば多様な実施形態において、少なくとも約1000倍、少なくとも約2000倍、少なくとも約3,000倍、少なくとも約4,000倍、または少なくとも約5,000倍増殖させる。濃縮及び増殖の1回以上のラウンドの後、少なくとも約 10^6 個、または少なくとも約 10^7 個、または少なくとも約 10^8 個、または少なくとも約 10^9 個の抗原特異的T細胞が得られる。

10

【0081】

T細胞前駆体の増殖、活性化及び分化に対するナノaAPCの影響を、当業者に知られる任意のいくつかの方法でアッセイしてもよい。増殖アッセイを用いて、各タイプのT細胞に特異的なマーカーを検出することにより、CTL、ヘルパーT細胞、または制御性T細胞の培養液中での増加を決定することによって、機能の迅速な決定を達成してもよい。こうしたマーカーは当該技術分野で既知である。サイトカイン産生に関して、またはクロム放出アッセイを用いて細胞溶解活性に関してアッセイすることによって、CTLを検出してもよい。

20

【0082】

適切なエフェクター機能を持つ抗原特異的T細胞を生成することに加えて、抗原特異的T細胞有効性に関する別のパラメータは、T細胞が病態部位に移動することを可能にする、ホーミング受容体の発現である(Sallustoら, Nature 401, 708-12, 1999、Lanzavecchia & Sallusto, Science 290, 92-97, 2000)。

【0083】

例えば、エフェクターCTL有効性は、ホーミング受容体の以下の表現型、CD62L⁺、CD45RO⁺、及びCCR7⁻に関連づけられてきている。したがって、ナノaAPC誘導及び/または増殖CTL集団は、これらのホーミング受容体の発現に関して特徴付け可能である。ホーミング受容体発現は、初期刺激条件に関連づけられる複雑な特質である。おそらく、これは、共刺激複合体ならびにサイトカイン環境の両方によって制御される。関連づけられてきている1つの重要なサイトカインはIL-12である(Salioら, 2001)。以下に論じるように、ナノaAPCは、生物学的転帰パラメータを最適化するため、個々に別々の成分(例えばT細胞エフェクター分子及び抗原提示複合体)を変動させる潜在能力を提供する。任意で、IL-12などのサイトカインが、初期誘導培養に含まれて、抗原特異的T細胞集団におけるホーミング受容体プロファイルに影響を及ぼすことも可能である。

30

40

【0084】

任意で、同じナノaAPCまたは第2のナノaAPCのいずれかとともに、第1の細胞集団中の抗原特異的T細胞の数に比較して、増加した数の抗原特異的T細胞を含む、第2の細胞集団を形成するために十分な期間、抗原特異的T細胞を含む細胞集団のインキュベーションを続けることも可能である。典型的には、こうしたインキュベーションを3~21日間、好ましくは7~10日間行う。

【0085】

適切なインキュベーション条件(培地、温度等)には、T細胞またはT細胞前駆体を培養するために用いられるもの、ならびにDCまたは人工的抗原提示細胞を用いて、抗原特異的T細胞の形成を誘導するために当該技術分野に知られるものが含まれる。例えば、L

50

atouche & Sadelain, Nature Biotechnol. 18, 405-09, April 2000、Levineら, J. Immunol. 159, 5921-30, 1997、Mausら, Nature Biotechnol. 20, 143-48, February 2002を参照されたい。また、以下の特定の実施例も参照されたい。

【0086】

増殖シグナルの度合いを評価するため、抗原特異的T細胞集団をCFSEで標識して、細胞分裂の速度及び数に関して分析してもよい。抗原が結合したナノaAPCで1~2ラウンド刺激した後、T細胞をCFSEで標識してもよい。その時点で、抗原特異的T細胞は、総細胞集団の2~10%に相当するはずである。抗原特異的T細胞の分裂速度及び数をCFSEの喪失によって追跡可能であるように、抗原特異的染色を用いて、抗原特異的T細胞を検出してもよい。刺激後の多様な時間(例えば、12、24、36、48、及び72時間)で、抗原提示複合体染色及びCFSEの両方に関して、細胞を分析してもよい。抗原が結合していないナノaAPCでの刺激を用いて、増殖のベースラインレベルを決定してもよい。任意で、当該技術分野に知られるように、3H-チミジンを観察することによって、増殖を検出してもよい。

10

【0087】

ナノaAPCを用いて得られる抗原特異的T細胞を、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与を含む、任意の適切な経路によって、患者に投与してもよい。患者には、ヒト及び獣医学的的患者が含まれる。

20

【0088】

抗原特異的制御性T細胞を用いて免疫抑制効果を達成して、例えば移植患者において、移植片対宿主病を治療するか若しくは防止し、または上記に列挙されるものなどの自己免疫疾患若しくはアレルギーを治療するか若しくは防止することも可能である。制御性T細胞の使用は、例えば、本明細書にその全体が援用される、US 2003/0049696、US 2002/0090724、US 2002/0090357、US 2002/0034500、及びUS 2003/0064067に開示される。

【0089】

これらの方法に従って調製される抗原特異的T細胞を、約 $5 \sim 10 \times 10^6$ CTL/体重kg(約 7×10^8 CTL/治療)から最大約 3.3×10^9 CTL/体重kg(約 6×10^9 CTL/治療)の範囲の用量で、患者に投与してもよい(Walterら, New England Journal of Medicine 333, 1038-44, 1995、Yeeら, J. Exp. Med. 192, 1637-44, 2000)。他の実施形態において、患者は、静脈内投与用量あたり、約 10^3 、約 5×10^3 、約 10^4 、約 5×10^4 、約 10^5 、約 5×10^5 、約 10^6 、約 5×10^6 、約 10^7 、約 5×10^7 、約 10^8 、約 5×10^8 、約 10^9 、約 5×10^9 、または約 10^{10} 個の細胞を投与されてもよい。さらに他の実施形態において、患者は、例えば、200 μ lポラス中、約 8×10^6 または約 12×10^6 個の細胞の結節内注射を投与されてもよい。細胞を投与されるナノAPCの用量には、用量あたり約 10^3 、約 5×10^3 、約 10^4 、約 5×10^4 、約 10^5 、約 5×10^5 、約 10^6 、約 5×10^6 、約 10^7 、約 5×10^7 、約 10^8 、約 5×10^8 、約 10^9 、約 5×10^9 、または約 10^{10} 個のナノaAPCが含まれる。

30

40

【0090】

例示的な実施形態において、濃縮及び増殖プロセスを、患者から得られた同じ試料に対して反復して行う。第0日にT細胞集団を濃縮し、活性化し、その後、適切な期間(例えば約3~20日)培養する。続いて、ナノaAPCを再び用いて、関心対象の抗原に対して濃縮しかつ増殖させ、さらに集団純度を増加させかつさらなるT細胞増殖のためにさらなる刺激を提供する。続いて、ナノaAPC及び濃縮T細胞の混合物を、再び、適切な期間、インビトロで培養するか、またはインビボでのさらなる増殖及び療法効果のため、患者に直接再注入する。望ましい増殖が達成されるまで、濃縮及び増殖を任意の回数、反復

50

してもよい。

【0091】

いくつかの実施形態において、各々異なる抗原に対するナノ a A P C のカクテルを一度に用いて、多数の抗原に対する抗原 T 細胞を同時に濃縮し、かつ増殖させてもよい。この実施形態において、各々異なる M H C - ペプチドを有する多数の異なるナノ a A P C バッチを組み合わせて、関心対象の各抗原に対する T 細胞を同時に濃縮するために用いる。生じる T 細胞プールは、これらの各抗原に対して濃縮され、活性化され、したがって、多数の抗原に対する反応物を同時に培養可能である。これらの抗原を単一の療法介入、例えば単一の腫瘍上に存在する多数の抗原に関連づけることも可能である。

【0092】

いくつかの実施形態において、患者は、養子移入による抗原特異的 T 細胞を投与される前に、または患者の腫瘍の遺伝子分析によってインビトロで同定されたネオ抗原を有する a A P C を直接投与される前に、1つ以上のチェックポイント阻害剤での免疫療法を受ける。多様な実施形態において、チェックポイント阻害剤（単数または複数）は、C T L A - 4 または P D - 1 / P D - L 1 の1つ以上をターゲットとし、これには、こうしたターゲットに対する抗体、例えばモノクローナル抗体、またはその一部、あるいはそのヒト化または完全ヒト型が含まれてもよい。いくつかの実施形態において、チェックポイント阻害剤療法は、イピリムマブまたはキートルーダ（ペンプロリズマブ）を含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、患者は、約 1 ~ 5 ラウンド（例えば、1、2、3、4 または 5 ラウンド）の養子免疫療法を受ける。いくつかの実施形態において、養子免疫療法の各投与を、チェックポイント阻害剤療法ラウンドと同時に、またはその後に（例えば約 1 日 ~ 約 1 週間後）行う。いくつかの実施形態において、養子免疫療法を、チェックポイント阻害剤療法の約 1 日後、約 2 日後、または約 3 日後に提供する。

【0094】

さらに他の実施形態において、患者へのナノ a A P C の養子移入または直接注入は、ピーズ上のリガンドとして、C T L A - 4 または P D - 1 / P D - L 1 の1つ以上をターゲットとするリガンドを含む。これらの実施形態において、本方法は、可溶性チェックポイント阻害剤療法を投与する、特定の副作用を回避し得る。

【0095】

個別化療法のための方法

いくつかの態様において、本発明は、個別化癌免疫療法のための方法を提供する。患者が反応するであろう抗原を同定するために a A P C を用い、その後、適切なペプチドを負荷した a A P C を患者に投与するか、またはエキスピボで抗原特異的 T 細胞を濃縮しかつ増殖させて、本方法を達成する。

【0096】

ゲノム規模の配列決定は、癌生物学の我々の理解を劇的に改変した。癌の配列決定は、多くのヒト癌の発生に関与する分子プロセスに関する重要なデータをもたらしてきた。3つの主な細胞プロセスである（1）細胞の運命、（2）細胞生存及び（3）ゲノム維持、を制御する経路に関与する重要な遺伝子において、それを推進する突然変異が同定されてきている。V o g e l s t e i n ら , S c i e n c e 3 3 9 , 1 5 4 6 - 5 8 (2 0 1 3) 。

【0097】

ゲノム規模配列決定はまた、癌免疫療法に対する我々のアプローチを改革する潜在能力を有する。配列決定データは、癌免疫療法のための共通のならびに個別化ターゲットの両方に関する情報を提供可能である。原理的には、突然変異タンパク質は、免疫系に対して外来性であり、かつ推定上の腫瘍特異的抗原である。実際、配列決定努力によって、数千とはいかなくとも数百の潜在的に適切な免疫ターゲットが定義されてきた。限定される研究によって、これらのネオエピトープは癌患者において見られ得るか、または癌ワクチンによって誘導可能であることが示されてきている。しかし、特定の癌に対するこうした反

10

20

30

40

50

応の頻度、及びこうした反応が患者間で共有される度合いはよく知られていない。腫瘍特異的免疫反応の我々の理解が限定される主な理由の1つは、潜在的に免疫学的に適切なターゲットを検証するための現在のアプローチが厄介であり、時間が掛かるためである。

【0098】

したがって、いくつかの態様において、本発明は、癌において、ネオ抗原に対するT細胞反応の検出のためのハイスループットプラットフォームに基づくアプローチを提供する。このアプローチは、癌抗原に対する低頻度T細胞反応であっても検出するために、本明細書記載のaAPCプラットフォームを用いる。こうした反応の頻度及び個人間の変動を理解することは、癌ワクチン及び個別化癌免疫療法の設計のための重要な暗示を与えるであろう。

10

【0099】

中枢性トレランスは、自己タンパク質に対するT細胞反応を抑制するが、発癌性突然変異は、T細胞反応を形成可能なネオエピトープを誘導する。全エクソーム配列決定由来の突然変異一覧は、こうしたネオエピトープを同定するための出発点を提供する。HLA結合予測アルゴリズム(Srivastava, PLoS One 4, e6094 (2009))を用いると、各癌が最大7~10のネオエピトープを有し得ると予測されてきている。同様のアプローチは、数百の腫瘍ネオエピトープがあると概算した。しかし、こうしたアルゴリズムは、T細胞反応を予測する正確性が低い可能性もあり、予測されるHLA結合エピトープのわずか10%しかHLAの状態において結合しないと予期される(Lundegaard C, Immunology 130, 309-18 (2010))。

20

【0100】

特定の実施形態において、ナノaAPC系を用いて、多様な癌において、または特定の患者の癌において、T細胞反応を誘導するネオエピトープに関してスクリーニングする。癌を、例えば全エクソーム配列決定によって遺伝子分析してもよい。例えば、24の進行した腺癌のパネルのうち、腫瘍あたり平均約50の突然変異が同定された。分析したおよそ20,000遺伝子のうち、1327が少なくとも1つの突然変異を有し、148が2つ以上の突然変異を有した。974のミスセンス突然変異が同定され、少数のさらなる数の欠失及び挿入があった。

30

【0101】

突然変異タンパク質における重複する9アミノ酸ウィンドウから、候補ペプチドのリストを生成してもよい。突然変異アミノ酸を含有するすべての9AAウィンドウ、及び各タンパク質由来の2つの、突然変異がない「対照」を選択する。NetMHC及び安定化マトリックス法(SMM)を含むMHC結合予測アルゴリズムのコンセンサスを用いて、MHC結合に関して、これらの候補ペプチドをコンピュータによって評価する。ナノaAPC及びMHC結合アルゴリズムは、主にHLA-A2アレルに関して開発されてきている。扱いやすい数の突然変異含有ペプチド(約500)及び突然変異のない対照ペプチド(約50)が同定されるまで、コンセンサス予測の感受性カットオフを調整してもよい。

40

【0102】

次いで、ペプチドライブラリーを合成する。MHC(例えばA2)を有するaAPCをマルチウェルプレート中に置き、ペプチドを受動的に負荷する。CD8⁺T細胞をA2陽性の健康なドナー及びA2陽性の膵臓癌患者(または他の癌若しくは本明細書記載の疾患)の両方のPBMCから単離してもよい。続いて、単離したT細胞を、濃縮段階用のプレート中で、負荷済みのaAPCとインキュベーションする。インキュベーション後、プレートを磁場に置き、aAPCに結合しない不適切なT細胞を含有する上清を除去する。aAPCに結合した、残ったT細胞を7~21日間、培養しかつ増殖させる。aAPCでの再刺激及び細胞内IFN γ 蛍光染色によって、抗原特異的増殖を評価する。

【0103】

いくつかの実施形態において、患者のT細胞をナノAPCのアレイまたはライブラリー

50

に対してスクリーニングして、結果を診断または予後判定目的のために用いる。例えば、突然変異タンパク質、過剰発現タンパク質、及び/または腫瘍関連抗原に対するT細胞抗腫瘍反応の数及び同一性をバイオマーカーとして用いて、リスクを層別化することも可能である。例えば、こうしたT細胞反応の数は、疾患進行のリスク、または化学療法に対する耐性若しくは非反応性のリスクに反比例し得る。他の実施形態において、患者のT細胞をナノAPCのアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングして、T細胞反応の存在、またはこれらのT細胞反応の数若しくは強度が、患者が無症候性腫瘍を有することを同定する、及び/または腫瘍生物学の最初の理解を提供する。

【0104】

いくつかの実施形態において、患者または対象のT細胞を、各々異なる候補ペプチド抗原を提示する常磁性aAPCのアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングする。この選別は、対象または患者のT細胞レパートリーに関する豊富な情報を提供することも可能であり、結果は、診断または予後判定目的に有用である。例えば、突然変異タンパク質、過剰発現タンパク質、及び/または腫瘍関連抗原に対するT細胞抗腫瘍反応の数及び同一性をバイオマーカーとして用いて、リスクを層別化し、免疫療法の有効性を観察し、または免疫療法治療の転帰を予測することも可能である。さらに、こうしたT細胞反応の数または強度は、疾患進行のリスクに反比例する可能性もあるし、または化学療法に対する耐性若しくは非反応性の予測因子である可能性もある。他の実施形態において、対象または患者のT細胞を、各々候補ペプチド抗原を提示するナノAPCのアレイまたはライブラリーに対してスクリーニングして、T細胞反応の存在、またはこれらのT細胞反応の数若しくは強度が、例えば自己免疫疾患を同定するか、または患者が無症候性腫瘍を有することを同定することによって、患者の健康状態に関する情報を提供する。これらの実施形態において、プロセスは、潜在的な疾患状態を同定するだけでなく、疾患生物学の最初の理解を提供する。

【0105】

試薬/キット

本発明の別の態様において、ナノaAPCを、濃縮及び増殖プロセスを実行するための成分とともに、キット中に提供することも可能である。ナノaAPCのための適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックを含む多様な材料から形成されてもよい。容器は無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。任意で、1つ以上の異なる抗原をナノaAPCに結合させてもよいし、または別個に供給してもよい。キットは、あるいはまたはさらに、1つ以上のマルチウェルプレートまたはT細胞用の培養プレートを含んでもよい。いくつかの実施形態において、キットは、aAPCS、磁石、及び任意で、試験管及び/または磁気濃縮を実行するための溶液若しくは緩衝液を含む。

【0106】

キットは、薬学的に許容され得る緩衝液、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液、またはデキストロス溶液を含む第2の容器をさらに含んでもよい。これはまた、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、最終使用者に有用な他の材料も含有してもよい。

【0107】

キットはまた、抗原特異的T細胞活性化または増殖の度合い及び有効性を評価するための試薬、例えば特定のマーカータンパク質に対する抗体、MHCクラスIまたはクラスII分子複合体、TCR分子複合体、抗クローン形質抗体等を含む。

【0108】

キットはまた、抗原特異的T細胞を誘導し、抗原特異的T細胞を増殖させ、多様なプロトコルにおいて、キット中のナノaAPCを用いる方法のための記載がなされた説明書を含む添付文書も含有してもよい。添付文書は、未承認のドラフト添付文書であってもよいし、または食品医薬品局(FDA)または他の規制機関によって認可された添付文書

10

20

30

40

50

であってもよい。

【実施例】

【0109】

実施例 1

養子 T 細胞療法は、継続性のある癌の退縮を仲介し得る。ナイーブ T 細胞から、機能する多数の腫瘍特異的 T 細胞を迅速に生成するため、本発明者らは、磁気カラム中で、稀な腫瘍特異的 T 細胞を濃縮すると同時に活性化することが可能な、ナノスケールの常磁性人工的抗原提示細胞を用いる、濃縮 + 増殖戦略を開発した。濃縮 + 増殖は、マウス及びヒト腫瘍特異的 T 細胞の 1000 倍を超える増殖を生じ、濃縮 + 増殖によって生成した腫瘍特異的 CTL で処置したマウスは、有意により少ない腫瘍増殖を有した。濃縮 + 増殖によって、費用効率的で再現性のある様式の多数の腫瘍特異的 T 細胞の生成を合理化することは、自己腫瘍免疫療法プロトコルの強力な補強となり得る。

10

【0110】

腫瘍特異的 T 細胞の養子移入は、継続性のある癌の退縮を仲介し得る¹。あらかじめ存在する抗腫瘍用反応物は、少数の癌患者からしか培養可能でないが²、腫瘍抗原でナイーブ前駆体細胞を刺激することによって、非常に多様な腫瘍抗原に特異的な T 細胞を生成可能である³。この培養プロセスは、各個々の患者に関して生成しなければならない複雑な生物製剤である⁴自己抗原提示細胞及びフィーダー細胞に頼っており、養子免疫療法のコスト及び複雑性を有意に増加させている。

20

【0111】

腫瘍特異的 T 細胞の増殖は、腫瘍特異的ナイーブ前駆体が、100 万あたり 1 個という少なさであるほど稀であることによって、さらに複雑になる⁵⁻⁷。有効な療法のために必要な多数の腫瘍特異的 T 細胞を生成するため⁸⁻¹⁰、リンパ球を何週間にも渡って抗原で反復刺激し、多くの場合、その後 T 細胞選択及びサブクロニングを行う¹¹。この労働力を要するプロセスは、最終細胞産物中の腫瘍特異的 T 細胞の総数及び抗原特異的頻度（または「純度」）の両方を増加させる。同時移入された無関係の細胞からの増殖シグナルに関する競合が、関心対象の抗腫瘍 T 細胞の恒常的な増殖を有意に減弱させるため、抗原特異的頻度は、移入後の最適な増殖のための独立した重要なパラメータである¹²⁻¹⁴。

30

【0112】

したがって、細胞性 APC またはフィーダー細胞の追加的な費用及び複雑性を伴わずに、ナイーブ前駆体から腫瘍特異的 T 細胞を多数及び高頻度で迅速に生成可能な技術が必要とされている。本発明は、したがって、ナノスケールの人工的抗原提示細胞（ナノ a APC）を用いた、T 細胞濃縮及び増殖戦略を提供する。本明細書に例示するナノ a APC は、内因性 APC によって送達される 2 つの活性化シグナル：MHC の状態で提示され TCR に結合する同族抗原性ペプチドであるシグナル 1；及び T 細胞反応を調節しかつ有効な活性化を促進するいくつかの共刺激受容体の 1 つであるシグナル 2、で機能化される、直径 50 ~ 100 nm の常磁性鉄デキストランナノ粒子である（図 1、上部）。したがって、常磁性ナノ a APC は、磁気濃縮カラムにおいて、同族 T 細胞を捕捉し、抗原特異的 T 細胞増殖を誘導することが可能である（図 1、下部）。

40

【0113】

ナイーブポリクローナルマウス CD8⁺ T リンパ球とナノ a APC をインキュベーションし、細胞 - 粒子混合物を磁気カラムに通過させ、溶出させ、次いで磁石結合画分を培養することによって、ナノ a APC での濃縮を行う（図 1）。濃縮有効性を評価するため、Db-gp100 黒色腫瘍抗原に特異的な、既知の数の Thy1.1⁺ pme1 TCR トランスジェニック T 細胞を、1 : 1000 の比で、B6 マウス由来の Thy1.2⁺ CD8⁺ T 細胞と混合した。pme1 gp100 特異的 a APC で濃縮した後、抗原特異的 pme1 T 細胞の頻度は、用量依存的様式で、濃縮前の 0.07% から、濃縮後の 1.17% に、10 倍超増加した（図 2A）。T 細胞とインキュベーションしたナノ a APC の量を最適化すると、濃縮効率が増加し、添加した pme1 T 細胞の最大 95%

50

の回収が生じた（図 2 B）。

【 0 1 1 4 】

内因性 B 6 C D 8 + 脾臓細胞からの野生型 D b - g p 1 0 0 細胞の濃縮を、可溶性 M H C 五量体での染色によって評価した。D b - g p 1 0 0 特異的頻度は、濃縮前には検出可能なレベル以下であったが、その後、0 . 3 0 % に増加した。D b - g p 1 0 0 粒子とインキュベーションした非特異的 K b - T r p 2 細胞の頻度は増加しなかった（図 2 C）。

【 0 1 1 5 】

濃縮後、濃縮細胞の磁石結合画分（陽性画分）及びナノ a A P C を溶出させ、インピットで培養した。続く増殖に対する濃縮の効果を研究するため、陰性画分（ナノ a A P C に結合しない C D 8 + T 細胞）を収集し、陽性画分に戻すことによって、対照試料において濃縮法を「取り消し」た（図 3 A）。

【 0 1 1 6 】

濃縮は、増殖後の抗原特異的頻度及び T 細胞総数を有意に増加させた。K b - T r p 2 ナノ a A P C で 7 日間濃縮した後、陰性 + 陽性の非濃縮群由来では細胞の 1 . 4 6 % であったのに比較して、陽性画分から増殖させた細胞の 1 7 . 6 % が、K b - T r p 2 特異的であった（図 3 B）。陰性 + 陽性画分ではより多くの細胞総数であったにも関わらず、濃縮法は、抗原特異的細胞総数について 2 ~ 3 倍の増加を生じた。本発明者らは、総 T 細胞増殖の増加がリンパ増殖性サイトカインに関する競合減少によって仲介され得ると仮定する。

【 0 1 1 7 】

濃縮 + 増殖アプローチは、g p 1 0 0 (D b - g p 1 0 0)、K b 拘束性オボアルブミン抗原 S I I N (K b - S I I N)、及び結腸癌抗原 L d - A H 1 / A 5 (L d - A 5) を含む、多様な腫瘍及びモデル T 細胞抗原に広く適用可能であった（図 3 D、3 E）。抗原特異的細胞の絶対数及び頻度は、抗原依存性であった。K b - S I I N 反応は、一貫して、1 週間後、2 0 % の抗原特異的細胞を生じたが、D b - g p 1 0 0 特異性はおよそ 5 % であり、L d - A 5 は総 T 細胞のおよそ 7 . 5 % であった。

【 0 1 1 8 】

関心対象の抗原に関する既知の前駆体頻度から T 細胞増殖を概算した（表 1）。外来抗原に対する C D 8 反応の前駆体頻度は、 $1 0 s \sim 1 0 0 s / 1 0 ^ 7$ の範囲であり⁷、T r p 2 などの自己抗原に関しては、この範囲の下限であると予期される。D b - g p 1 0 0 に関する前駆体頻度は、 $1 0 ^ 7$ 中の 1 0 であり⁵、K b - S I I N F に関しては、 $1 0 ^ 7$ 中の 4 0 ~ 3 5 0 であることが測定されている。1 週間後、 $1 0 ^ 7$ 個のポリクローナル C D 8 T 細胞から、1 5 0 , 0 0 0 個の T r p 2 特異的細胞が生成され、したがって、本発明者らは、T r p 2 特異的増殖が、1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍の間であると概算する。比較すると、 $1 0 ^ 7$ 個の T 細胞から、およそ 3 5 , 0 0 0 個の D b - g p 1 0 0 及び 1 5 0 , 0 0 0 個の K b - S I I N F 特異的 T 細胞が生成され、各抗原に対して、最大 5 , 0 0 0 倍の増殖があることが示された。これはインピットでのウイルス感染後に観察される口バスタな増殖に匹敵する^{1 8}。

【 0 1 1 9 】

これらの概算を検証するため、本発明者らは、ナイーブ T 細胞集団を、T 細胞分裂のラウンドごとに半分に希釈される増殖マーカー色素 C F S E で標識した。E + E の 4 日後、K b - T r p 2 四量体結合 T 細胞は、検出可能限界以下までその C F S E を希釈した。ナノ a A P C の中程度の用量で刺激したトランスジェニック p m e 1 T 細胞を比較のために用い、これらの細胞は、C F S E 蛍光の多数のピークを示し、分裂が 2 ~ 7 ラウンドであることが示された。これにより、本発明者らは、濃縮 + 増殖 T r p 2 特異的 T 細胞が、7 ラウンドより多くの分裂を完了したと決定することが可能であり、これは、わずか 4 日後に 2 5 6 倍より多く増殖したことと一致した。増殖 T 細胞は、C D 6 2 L 低 C D 4 4 高エフェクター記憶表現型を示し、これは口バスタな活性化及び増殖と一致した。

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

50

E + EによるT細胞増殖を、Trp 2ペプチドでパルス処理した成熟骨髄由来樹状細胞を用いた増殖と比較した。1000万個のナイーブリンパ球の刺激は、 $2 \pm 0.5 \times 10^4$ 個のTrp 2特異的T細胞を生じ、抗原特異的頻度は、0.5 ~ 2.85%であり、E + Eで達成されるものより数及び頻度がおよそ10倍低かった。これは、ヒトにおけるAPC及び人工的APCによる増殖と一致し、この場合、刺激1週間後の抗原特異的反応は、しばしば検出不能である¹⁹。

【0121】

多数の腫瘍抗原に対するT細胞反応の同時生成は、単一のナイーブT細胞集団から生成される抗腫瘍T細胞の数を増加させ、単一の抗原の下方制御による腫瘍免疫エスケープの可能性を減少させるであろう^{20 ~ 22}。本発明者らは、したがって、多数の抗腫瘍集団を同時に生成するための一ステップE + Eプロトコルを発展させた。

10

【0122】

ナイーブリンパ球を、各々、標準的な単一抗原用量で、Db - gp 100、Kb - SIIN F、及びKb - Trp 2 MHC二量体を有するナノAPCとインキュベーションした。「三重」E + Eの1週間後、関心対象の各抗原に対する五量体染色によって、抗原特異的T細胞を検出した(図3F)。各集団の頻度は、1つのみの抗原で刺激した対照試料で見られるものよりも低く(図3G)、一方、個々にまたは同時に単離されても、抗原特異的細胞総数は同じであった(2元配置ANOVAによって、 $p > 0.4$) (図3G)。したがって、三重E + Eプロトコルは、各腫瘍特異的T細胞集団に関して、任意の単一抗原対照と同程度に効率的であった。

20

【0123】

養子移入した腫瘍特異的T細胞は、同時移入した非腫瘍特異的バスタンダー細胞と、増殖シグナルに関して競合する^{12 ~ 14}。しかし、この効果は、濃縮 + 増殖中に起こるように、インビトロで以前活性化されていたT細胞の抗原特異的増殖に関しては立証されてきていなかった。

【0124】

したがって、本発明者らは、腫瘍特異的pme1 T細胞及びポリクローナル野生型B6細胞を、E + Eを用いて、及び用いずに達成された抗原特異的頻度とほぼ同じ比で合わせた(それぞれ10%及び1%)。各群において、投与されるpme1 T細胞の総数は同じ(10^5 個)であり、バスタンダーT細胞の量のみが異なる(10^6 個または 10^7 個)。より少ない(10^6 個)バスタンダー細胞を投与されたマウスにおいて、pme1 T細胞の最大数及び最高の頻度が観察された(図4A及びB)。およそ $5.5 \pm 1.5 \times 10^5$ 個のpme1 T細胞がこれらの動物の脾臓及びリンパ節から回収された(図4B)。 10^7 個のバスタンダー細胞を投与された動物からは、 $1.4 \pm 0.7 \times 10^5$ 個のpme1 T細胞しか回収されなかった(テューキーの事後検定を伴う2元配置ANOVAによって、 $p < 0.05$)。したがって、同時移入細胞から競合を除くことによって、移入後の生着及び増殖が増進された。

30

【0125】

さらに、腫瘍特異的T細胞は、増殖シグナルに関して、宿主細胞と競合するので²⁴、これは養子移入前に宿主の放射線及び化学療法に基づくリンパ枯渇を行う動機を与えてきた^{25, 26}。したがって、 10^6 個または 10^7 個のバスタンダー細胞を投与される動物は、移入の24時間前に500cGyガンマ照射で照射されるか、または未処置のままとされ、4つの実験群が設けられた。照射されなかった動物は、生着が劣り、 10^6 個または 10^7 個のバスタンダー群のいずれにおいても、 0.3×10^5 個のpme1 T細胞未満しか回収されなかった(図4A及びB)。したがって、移入されたバスタンダーリンパ球及び/または宿主リンパ球の両方の除去は、宿主における養子移入腫瘍特異的T細胞の収量を有意に増加させた。

40

【0126】

本発明者らは次に、ナノAPCでの濃縮 + 増殖によって生成された腫瘍特異的リンパ球が、確立された黒色腫の排除を仲介することを確認した。免疫原性が劣る侵襲性黒色腫

50

モデルである B 1 6 - F 1 0 細胞を、B 6 宿主マウス内に皮下移植して、腫瘍が触診可能になるまで 8 日間増殖させた。平行して、天然 B 6 ドナーマウスから C D 8 リンパ球を単離し、D b - G P 1 0 0 及び K b - T r p 2 抗原に対して濃縮 + 増殖させ、次いでリンパ枯渇の 1 日後に、宿主内に移入した。

【 0 1 2 7 】

腫瘍特異的 E + E ドナーリンパ球を投与された動物は、未処置マウス、または無関係の K b - S I I N F 抗原に対して生成された同等数のリンパ球を投与されたマウスよりも、有意に腫瘍増殖がより少なかった (図 4 C)。腫瘍注射の 1 8 日後、K b - S I I N F 処置マウスに関して $1.44 \pm 1.1 \text{ mm}^2$ であり、D b - g p 1 0 0 / K b - T r p 2 マウスに関して $2.2 \pm 0.9 \text{ mm}^2$ であったのに比較して、未処置マウスの平均腫瘍面積は $1.30 \pm 1.2 \text{ mm}^2$ であった (テューキーの事後検定を伴う A N O V A によって、 $p < 0.05$)。

10

【 0 1 2 8 】

未処置及び K b - S I I N F 処置群のすべてのマウスを、第 2 2 日までに、過剰な腫瘍負荷が理由で屠殺した。これに比較して、D b - g p 1 0 0 / K b - T r p 2 群では、第 2 4 日まで屠殺されるマウスはなく、移植 2 ヶ月後でも、2 / 8 のマウスでは腫瘍は検出不能であった (マンテル - コックスによって、 $p < 0.01$)。生存中央値は、未処置 (2 0 日) または非同族処置 (2 0 日) 群よりも E + E 処置群 (2 8 日) で有意に長かった。ナイーブ細胞から 1 週間しか培養しなかった E + E リンパ球は、確立された B 1 6 黒色腫を遅延させ、いくつかの例では完全に排除可能であった。

20

【 0 1 2 9 】

H L A - A 2 で機能化されたナノ a A P C による濃縮 + 増殖はまた、ナイーブリンパ球からのヒト抗腫瘍反応物を増殖させる際にも有効である。ヒト C D 8 + リンパ球を、健康なドナーの末梢血単核細胞から単離し、N Y - E S O 1 または M A R T 1 腫瘍抗原のいずれかを有するナノ a A P C で E + E を行った。1 週間後、 $44,000 \pm 21,000$ の N Y - E S O 1 特異的細胞が生成され、これはおよそ 1000 倍の前駆体増殖に相当した (表 1、図 5)。M A R T 1 反応に関して、1 週間で $83,000 \pm 37,000$ が生成され、これは、およそ 100 倍の増殖に相当し、健康なドナー 2 7 においてさえ見られる、M A R T 1 反応の高い前駆体頻度を反映した (表 1、図 5)。したがって、濃縮 + 増殖は、マウス T 細胞には限定されず、ナイーブ低頻度抗腫瘍ヒト C T L の増殖のためにもロバスタなアプローチである。

30

【 0 1 3 0 】

癌のための養子免疫療法の広い適用は、腫瘍特異的細胞の費用効率的でかつ好適な供給源の入手可能性によって制限される。ここで、本発明者らは、1 週間に 1000 倍を超えて、ナイーブ細胞から多数の高頻度の腫瘍特異的リンパ球を迅速に増殖させるための合理化された技術を開発した。本発明者らはさらに、濃縮によって不適切なバイスタンダー細胞を除去すると、インピトロ培養中、及びインピボでの養子移入後の両方で、腫瘍特異的 T 細胞に対して有意な生存及び増殖上の利点が与えられることを立証する。

【 0 1 3 1 】

T 細胞増殖後、M H C 四量体を用いて、抗原特異的 T 細胞を濃縮可能である ^{2 8 - 3 0} 一方、本発明者らのプラットフォームは、単一の試薬で濃縮及び増殖の実行を可能にすることによって、このプロセスを単純化する。さらに、共刺激の非存在下で、多量体 M H C による T C R の架橋は、T 細胞アポトーシスまたはアネルギーを誘導可能であり ^{3 1 - 3 3}、四量体結合後、抗原特異的細胞のうち最大で半数の欠失が生じた。したがって、T 細胞濃縮及び増殖両方のための単一プラットフォームの使用は、現存するプロトコルを単純化し、改善する。

40

【 0 1 3 2 】

ここで、リンパ球が抗癌 T C R またはキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子操作することによって、腫瘍特異的 T 細胞を生成可能であり ¹、該細胞は、増加する利用可能性に対して有望なアプローチであるが、内因性トランス機構によって調節され

50

ていない外来受容体を使用すると、理論的には、交差反応性及び毒性の可能性が増加し、試験においては有意な毒性が観察される^{3 4}。自己黒色腫浸潤性リンパ球は、臨床試験において非常に有効であることが証明されているが、すべての黒色腫患者からは培養不能でありまたは大部分の他の癌に関しては培養不能である²。

【0133】

内因性ナイーブ細胞からの反応を生成するための信頼性がある方法は、したがって、利用可能性及び安全性の両方を増加させ得る³。既存のプロトコルは、ナイーブ細胞由来の反応物を伴う有望な結果を示してきた^{3 5, 3 6}が、注入あたりに投与される $10^8 \sim 10^{10}$ 個の腫瘍反応性T細胞^{3 6 \sim 3 8}を生じるために、数週間から数ヶ月掛かる反復刺激及びクローニングに頼っており、高額のコスト及び複雑さを生じる。E + Eは、既存の試みに比較して、総数及び純度の両方に関して有望な新規アプローチであり、より短い期間で、ロバストな増殖を生じる。例えば、培養1週間後の樹状細胞に基づくアプローチでのNY-ESO1の増殖は、検出不能であるかまたは報告されないかのいずれかであり、1000倍の増殖で4~27%の抗原特異的純度の達成を生じ、すべてより顕著である。対照的に、いくつかのグループが、高い前駆体頻度のMART1反応物の有効な増殖を報告している。例えば、Wolfら^{3 9}によって記載されるDCに基づく新規ACE-CD8プラットフォームは、ヒトCD8細胞の増殖のための要件を定義し、最適化するのを補助する際に非常に有用であり、かつ10日間の印象的な増殖を示す、よく特徴付けられた系であり、インビトロの最適なMART1増殖を補助するために、培養条件のさらなる最適化が必要であることを示唆する。にもかかわらず、臨床的に必要とされ得るT細胞の量を生成するため、DCに基づくACE-CD8プラットフォームはなお、増殖または非抗原特異的技術の使用のために、DCの毎週の培養物を生成するため、潜在的に多数回の患者からのプラズマフェレシスを必要とするであろう。ナノaAPCに基づくE + Eは、こうした制約にはさらされない。

10

20

【0134】

腫瘍特異的T細胞前駆体の頻度が100万あたりおよそ1~10であり、単回の白血球取り出し物から、およそ 0.5×10^{10} 個のCD8 T細胞が採取され、E + Eで1000~5000倍の増殖が観察されると仮定すると、1週間に 10^8 個を超える抗原特異的T細胞が生成可能である。多数の抗原を同時に増殖すると、この数はさらに増加し、注入のための十分な細胞が得られる。したがって、細胞性APCを培養する必要がなくなり、かつ多数の高頻度腫瘍特異的T細胞の生成を合理化することによって、濃縮 + 増殖は、自己腫瘍免疫療法プロトコルの強力な補強になり得る。

30

【0135】

方法

マウス及び試薬。Pmel1 TCR/Thy1a Rag-/-トランスジェニックマウスをホモ接合体で維持した。C57BL/6j及びBalb/Cマウスを、Jackson Laboratories (メイン州バーハーバー)より購入した。ジョンズホプキンス大学施設管理委員会に従って、すべてのマウスを飼育した。蛍光標識モノクローナル抗体を、BioLegend (カリフォルニア州サンディエゴ)より購入した。

40

【0136】

MHC-Ig二量体及びナノaAPCの調製。記載されたように、可溶性MHC-Ig二量体、Kb-Ig、Db-Ig、及びA2-Igを調製し、これにペプチドを負荷した^{1 9}。記載されたように、MHC-Ig二量体及び抗CD28抗体(37.51、BioLegend)を、MACSマイクロビーズ(Miltenyi Biotec)に直接コンジュゲートすることによって、ナノaAPCを製造した^{1 5}。

【0137】

リンパ球単離。マウス脾臓及びリンパ節のホモジナイズ、その後、RBCの低張溶解から、マウスリンパ球を得た。製造者のプロトコルに従って、Miltenyi Biotec (ドイツ・ケルン)のCD8ノータッチ単離キット及び磁気濃縮カラムを用いて、細胞傷害性リンパ球を単離した。適用可能な場合、細胞をカルボキシフルオレセイン・スク

50

シニミジルエステル (CFSE) で、37 で15分間標識し、次いで徹底的に洗浄した。ヒト研究のため、ジョンスホプキンス大学の倫理委員会は本研究を承認し、すべての健康な志願者は書面のインフォームドコンセントを提出した。HLA-A2+ドナーのPBMCを、密度勾配遠心分離 (リンパ球分離培地 Ficoll-Paque、GE Healthcare) によって得た。続いて、製造者のプロトコルに従って、Miltenyi Biotec (ドイツ・ケルン) のCD8ノータッチ単離キット及び磁気濃縮カラムを用いて、CD8+ T細胞を単離した。精製CD8+ T細胞をNanoAPCで、4で1時間染色し、MS-カラム (Miltenyi Biotec) を利用して、磁氣的に濃縮した。

【0138】

濃縮及び増殖。1000万個のCD8濃縮リンパ球を、10 μ lのNanoAPCと、4で1時間インキュベーションした。続いて細胞-粒子混合物を磁気濃縮カラムに通過させ、陰性画分を収集し、そして陽性画分を溶出させた。単離画分を混合し、96ウェル丸底プレート中、10%ヒト自己血清及び3% T細胞増殖因子 (TCGF) を補充した完全RPMI-1640培地中、96ウェル丸底プレート (Falcon) において、5% CO₂ を提供する加湿インキュベーター中で、37 で1週間培養した。培地及びTCGFを週1回補充した。FACS分析を利用して、四量体及びMHC-Ig染色によって、CTLの特異性を第0日及び第7日に観察した。

【0139】

バイスタンダーインビボ実験。pme1及び野生型B6 CD8+ Tリンパ球の混合物を、示す比で混合した。養子移入前に、20 μ lのDb-gp100 NanoAPCと細胞混合物を1週間培養した。示した群において、養子移入の1日前に、MSD Nordion GammacellデュアルCs137供給源 (ジョンスホプキンス分子画像化センター) で、致死量以下の照射 (500cGy) によって、宿主マウスにおいて一過性リンパ球減少症を誘導した。養子移入当日及び翌日の両方で、マウスを30,000単位の腹腔内IL-2で処置した。養子移入の7日後及び20日後、群あたり3匹のマウスを屠殺し、末梢血、脾臓、ならびに鼠径、頸部及び腋窩リンパ節からリンパ球を単離し、次いで抗Thy1.1抗体で染色した。

【0140】

腫瘍排除実験。3 \times 10⁵個のB16黒色腫細胞を、養子T細胞移入の10日前に皮下注射したことを除いて、上述のように腫瘍排除実験を行った。上述のように、養子移入の1日前に、一過性のリンパ減少症を誘導した。各ドナー由来の1000万のナイーブリンパ球を用いて、各腫瘍宿主 (ドナーあたり最大3の宿主) に関して抗原特異的細胞を生成し、これは培養1週間後におよそ2 \times 10⁵個の腫瘍特異的T細胞が生成され、移入されたことに相当した。養子移入当日及び翌日の両方で、マウスを30,000単位の腹腔内IL-2で処置した。デジタルノギスを用いて、腫瘍増殖を2日間隔で観察した。腫瘍がひとたび150mm²に到達したら、マウスを屠殺した。

【0141】

(表1) 抗原特異的T細胞増殖。1000万個のリンパ球あたりの概算されるT細胞前駆体頻度。1000万個のリンパ球から生成される抗原特異的細胞 (参照を含む)。

10

20

30

40

抗原	前駆体頻度 (1000万細胞あたり)	抗原特異的細胞	増殖倍率
Kb-Trp2	10-100 ⁷	130,000 ±80,000	1,300～13,000 倍
Db-gp100	10-100 ⁵	35,000±10,000	350～3,500 倍
Kb-SIINF	20-350 ⁷	150,000±75,000	450～7,500 倍
A2-NY-ESO1	36 ²⁷	44,000±21,000	1200倍
A2-MART1	1000 ²⁷	83,000±37,000	83倍

10

【 0 1 4 2 】

実施例 2

ネオ抗原の増殖

これまでに記載された腫瘍抗原は、腫瘍において過剰発現されるタンパク質由来の既知の「共通の抗原」であり、多数の患者由来の腫瘍上に存在し、または腫瘍間で共有される。ゲノム規模配列決定の出現により、大部分の癌が、患者の MHC に結合する可能性があるクローン性非同義一塩基対置換を含有することが示されてきており、これによって、免疫療法のための新しい道が開かれた^{2 9}。続く分析はこのアイデアを補強した^{3 8 - 4 5}。これらの「ネオ抗原」は、腫瘍ターゲットとして、共通の抗原よりも理論的な利点、例えば腫瘍組織に対するより高い特異性及び潜在的により高いアフィニティの TCR - MHC 相互作用を有する。しかし、突然変異のパターンは各癌においてユニークであり、迅速な個別化同定及びこれらのネオ抗原のターゲティングのための方法を開発しなければならない。

20

【 0 1 4 3 】

濃縮 + 増殖を用いて、ネオ抗原に対する T 細胞反応を生成するため、本発明者らは、マウス黒色腫株 B 1 6 及び結腸癌株 C T 2 6 に関して記載される公表された「ミュートーム」を利用した^{4 6 , 4 7}。簡潔には、ゲノム及びトランスクリプトームデータセットを合わせて、発現される一塩基対置換を同定した (図 6 A)。各 SBS の上流及び下流の 8 または 9 個の隣接アミノ酸をインシリコで抽出した。次いで、これらの約 17 アミノ酸配列を、人工的ニューラルネットワークを用いてヒト HLA ならびにマウス MHC アレルへのペプチドの結合を予測するアルゴリズムである NetMHC によってプロセッシングした^{4 8}。このアルゴリズムは、C T 2 6 及び B 1 6 に関して、長さ 8 ~ 10 アミノ酸のアミノ酸ネオエピトープを予測した (表 2)。広い範囲の予測されるアフィニティを示す 7 つの候補ペプチドであって、2 つが C T 2 6 由来であり、5 つが B 1 6 由来であるペプチドを合成し、これを用いて、ネオエピトープ特異的ナノ a APC を生成した。これらのネオエピトープを有するナノ a APC を用いた E + E を次いで実行し、第 7 日に MHC 多量体で評価した。

30

40

【 0 1 4 4 】

第 7 日由来の抗原特異的培養物を、試験した 2 つの C T 2 6 由来候補ペプチド (F P S 及び S A F) の両方に関して同定した。図 6 B は、L d - F P S 及び L d - S A F 活性化試料の代表的な第 7 日同族 MHC 染色を示す。B 1 6 ミュートーム由来のペプチドは、反応性 (D b - Y T G) 及び非反応性 (K b - L A Y) 染色パターンを示し (図 6 B)、調べた全体のうち 2 / 5 のペプチド (D b - Y T G 及び K b - V D W) が強い反応を示し、2 / 5 が中程度の反応を示し (D b - I A M 及び D b - R T F)、1 / 5 が非反応性であ

50

った (K b - L A Y) 。 N e t M H C によって予測されるような M H C に対するペプチドアフィニティ (表 2) は E + E 反応を正確には予測せず ; 強い反応因子 Y T G 及び V D W はそれぞれ、 9 9 1 及び 9 0 6 6 n M で低い予測アフィニティを有し、一方、非反応因子 L A Y 及び不確かな反応因子 I A M はそれぞれ、 6 9 及び 5 n M で高い予測アフィニティを有した。総合すると、第 7 日で生成される細胞の総数は、共通の抗原 D b - G P 1 0 0 及び L d - A 5 で観察されるものとほぼ同じで、 1 5 , 0 0 0 ~ 4 0 , 0 0 0 個の範囲である (図 6 C) が、共通の抗原 K b - T R P 2 及び K b - S I I N より少なかった。

【 0 1 4 5 】

(表 2) 候補ネオエピトープ

ペプチドに関する最適タンパク質 (黄色=10mer)	突然変異ペプチド (10mer を含む)	予測されるアフィニティ (nM)	アレル
Actn4	VTFQAFIDV	210	H-2-Kb
Atp11a	QSLGFITYL	19	H-2-Kb
Cpsf31	RTFANNPGPM	2043	H-2-Db
Dag1	TTTTKKARV	2024	H-2-Kb
Ddb1	VLMINGEEV	153	H-2-Db
Ddx23	QTAMFTATM	112	H-2-Kb
Dpf2	LALPNNYCDV	318	H-2-Db
Eef2	ESFAFTADL	277	H-2-Kb
Fat1	IAMQNTTQL	5	H-2-Db
Fzd7	VAHVAAFL	87	H-2-Kb
Kif18b	VDWENVSPEL	9066	H-2-Kb
Mthfd11	TILNCFHDV	1761	H-2-Kb
Orc2	VVPSFSAEI	39	H-2-Kb
Pbk	AAVILRDAL	121	H-2-Db
Plod2	VWQIFENPV	111	H-2-Kb
S100a132510039O18	TVVCTFFTF	379	H-2-Kb
Sema3b	VSAAQAERL	1487	H-2-Kb
Tm9sf3	AIYHHASRAI	191	H-2-Kb
Tnpo3	LAYLMKGL	69	H-2-Kb
Tubb3	YTGEAMDEM	991	H-2-Db
Wdr82	TNGSFIRLL	87	H-2-Kb

N e t M H C によって予測されるような M H C アフィニティを含む、 B 1 6 腫瘍由来のネオエピトープを含有する候補ペプチド配列のリスト

【 0 1 4 6 】

実施例 2 のみの参考文献

- (1) Restifo, N. P.; Dudley, M. E.; Rosenberg, S. a. Adoptive Immunotherapy for Cancer: Harnessing the T Cell Response. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 269–281.
- (2) Barrett, D. M.; Singh, N.; Porter, D. L.; Grupp, S. a; June, C. H. Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer. *Annu. Rev. Med.* **2014**, *65*, 333–347.
- (3) Kershaw, M. H.; Westwood, J. a; Darcy, P. K. Gene-Engineered T Cells for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 525–541.
- (4) Yee, C. The Use of Endogenous T Cells for Adoptive Transfer. *Immunol. Rev.* **2014**, *257*, 250–263.

- (5) Morgan, R. A.; Chinnasamy, N.; Abate-daga, D.; Gros, A.; Robbins, P. F.; Zheng, Z.; Dudley, M. E.; Feldman, S. A.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; *et al.* Cancer Regression and Neurological Toxicity Following Anti-Mage-A3 TCR Gene Therapy. *J. Immunother.* **2013**, *36*, 133–151.
- (6) Zhong, S.; Malecek, K. T-Cell Receptor Affinity and Avidity Defines Antitumor Response and Autoimmunity in T-Cell Immunotherapy. *Proc. ...* **2013**, *110*. 10
- (7) Wherry, E. J. T Cell Exhaustion. *Nat. Immunol.* **2011**, *131*, 492–499.
- (8) Rabinovich, G. a; Gabrilovich, D.; Sotomayor, E. M. Immunosuppressive Strategies That Are Mediated by Tumor Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 267–296.
- (9) Dudley, M. E.; Rosenberg, S. a. Adoptive-Cell-Transfer Therapy for the Treatment of Patients with Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 666–675. 20
- (10) Itzhaki, O.; Hovav, E.; Ziporen, Y.; Levy, D.; Kubi, A.; Zikich, D.; Hershkovitz, L.; Treves, A. J.; Shalmon, B.; Zippel, D.; *et al.* Establishment and Large-Scale Expansion of Minimally Adoptive Transfer Therapy. *J Immunother.* **2011**, *34*, 212–220.
- (11) Satthaporn, S.; Robins, A.; Vassanasiri, W.; El-Sheemy, M.; Jibril, J. a; Clark, D.; Valerio, D.; Eremin, O. Dendritic Cells Are Dysfunctional in Patients with Operable Breast Cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2004**, *53*, 510–518. 30
- (12) Hurwitz, A. a; Watkins, S. K. Immune Suppression in the Tumor Microenvironment: A Role for Dendritic Cell-Mediated Tolerization of T Cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 289–293.
- (13) Ma, Y.; Shurin, G. V; Gutkin, D. W.; Shurin, M. R. Tumor Associated Regulatory Dendritic Cells. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 298–306. 40
- (14) Perica, K.; De León Medero, A.; Durai, M.; Chiu, Y. L.; Bieler, J. G.; Sibener, L.; Niemöller, M.; Assenmacher, M.; Richter, A.; Edidin, M.; *et al.* Nanoscale Artificial Antigen Presenting Cells for T Cell Immunotherapy. *Nanomedicine* **2013**, *10*, 119–129.

- (15) Zhang, N.; Bevan, M. J. CD8(+) T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **2011**, *35*, 161–168.
- (16) Fahmy, T. M.; Bieler, J. G.; Edidin, M.; Schneck, J. P. Increased TCR Avidity after T Cell Activation: A Mechanism for Sensing Low-Density Antigen. *Immunity* **2001**, *14*, 135–143.
- (17) Perica, K.; Tu, A.; Richter, A.; Bieler, J. G.; Edidin, M.; Schneck, J. P. Magnetic Field-Induced T Cell Receptor Clustering by Nanoparticles Enhances T Cell Activation and Stimulates Antitumor Activity. *ACS Nano* **2014**, *8*, 2252–2260. 10
- (18) He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of Particle Size and Surface Charge on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3657–3666.
- (19) Decuzzi, P.; Godin, B.; Tanaka, T.; Lee, S.-Y.; Chiappini, C.; Liu, X.; Ferrari, M. Size and Shape Effects in the Biodistribution of Intravascularly Injected Particles. *J. Control. Release* **2010**, *141*, 320–327. 20
- (20) Semete, B.; Booyesen, L.; Lemmer, Y.; Kalombo, L.; Katata, L.; Verschoor, J.; Swai, H. S. In Vivo Evaluation of the Biodistribution and Safety of PLGA Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 662–671.
- (21) Schamel, W. W. a; Alarcón, B. Organization of the Resting TCR in Nanoscale Oligomers. *Immunol. Rev.* **2013**, *251*, 13–20. 30
- (22) Rizzuto, G. a; Merghoub, T.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Liu, C.; Lesokhin, A. M.; Sahawneh, D.; Zhong, H.; Panageas, K. S.; Perales, M.-A.; Altan-Bonnet, G.; *et al.* Self-Antigen-Specific CD8+ T Cell Precursor Frequency Determines the Quality of the Antitumor Immune Response. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 849–866.
- (23) Jenkins, M. K.; Chu, H. H.; McLachlan, J. B.; Moon, J. J. On the Composition of the Preimmune Repertoire of T Cells Specific for Peptide-Major Histocompatibility Complex Ligands. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 275–294. 40
- (24) Jenkins, M. K.; Moon, J. J. The Role of Naive T Cell Precursor Frequency and Recruitment in Dictating Immune Response Magnitude. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 4135–4140.

- (25) Chapuis, A.; Ragnarsson, G. Transferred WT1-Reactive CD8+ T Cells Can Mediate Antileukemic Activity and Persist in Post-Transplant Patients. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 174ra27.
- (26) Klebanoff, C. a; Gattinoni, L.; Palmer, D. C.; Muranski, P.; Ji, Y.; Hinrichs, C. S.; Borman, Z. a; Kerkar, S. P.; Scott, C. D.; Finkelstein, S. E.; *et al.* Determinants of Successful CD8+ T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5343–5352. 10
- (27) Wen, F.; Thisted, R. A Systematic Analysis of Experimental Immunotherapies on Tumors Differing in Size and Duration of Growth. ... **2012**, 172–178.
- (28) Besser, M. J.; Shapira-Frommer, R.; Treves, A. J.; Zippel, D.; Itzhaki, O.; Hershkovitz, L.; Levy, D.; Kubi, A.; Hovav, E.; Chermoshniuk, N.; *et al.* Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-Term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2646–2655. 20
- (29) Segal, N. H.; Parsons, D. W.; Peggs, K. S.; Velculescu, V.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Allison, J. P. Epitope Landscape in Breast and Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 889–892.
- (30) Smith-Garvin, J. E.; Koretzky, G. a; Jordan, M. S. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 591–619. 30
- (31) Durai, M.; Krueger, C.; Ye, Z.; Cheng, L.; Mackensen, A.; Oelke, M.; Schneck, J. P. In Vivo Functional Efficacy of Tumor-Specific T Cells Expanded Using HLA-Ig Based Artificial Antigen Presenting Cells (aAPC). *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 209–220.
- (32) Sarkar, S.; Teichgräber, V.; Kalia, V.; Polley, A.; Masopust, D.; Harrington, L. E.; Ahmed, R.; Wherry, E. J. Strength of Stimulus and Clonal Competition Impact the Rate of Memory CD8 T Cell Differentiation. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 6704–6714. 40
- (33) Oelke, M.; Kurokawa, T.; Hentrich, I.; Behringer, D.; Cerundolo, V.; Lindemann, A. Functional Characterization of CD8 1 Antigen-Specific Cytotoxic T

Lymphocytes after Enrichment Based on Cytokine Secretion : Comparison with the MHC-Tetramer Technology. **2000**, 544–549.

- (34) Oelke, M.; Maus, M. V; Didiano, D.; June, C. H.; Mackensen, A.; Schneck, J. P. Ex Vivo Induction and Expansion of Antigen-Specific Cytotoxic T Cells by HLA-Ig-Coated Artificial Antigen-Presenting Cells. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 619–624.
- (35) Seliger, B. Molecular Mechanisms of MHC Class I Abnormalities and APM Components in Human Tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 1719–1726. 10
- (36) Kaluza, K. M.; Thompson, J. M.; Kottke, T. J.; Flynn Gilmer, H. C.; Knutson, D. L.; Vile, R. G. Adoptive T Cell Therapy Promotes the Emergence of Genomically Altered Tumor Escape Variants. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 844–854.
- (37) Jensen, S. M.; Twitty, C. G.; Maston, L. D.; Antony, P. a; Lim, M.; Hu, H.-M.; Petrausch, U.; Restifo, N. P.; Fox, B. a. Increased Frequency of Suppressive Regulatory T Cells and T Cell-Mediated Antigen Loss Results in Murine Melanoma Recurrence. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 767–776. 20
- (38) Duan, F.; Duitama, J.; Al Seesi, S.; Ayres, C. M.; Corcelli, S. a.; Pawashe, a. P.; Blanchard, T.; McMahon, D.; Sidney, J.; Sette, a.; *et al.* Genomic and Bioinformatic Profiling of Mutational Neoepitopes Reveals New Rules to Predict Anticancer Immunogenicity. *J. Exp. Med.* **2014**. 30
- (39) Rajasagi, M.; Shukla, S. a; Fritsch, E. F.; Keskin, D. B.; DeLuca, D.; Carmona, E.; Zhang, W.; Sougnez, C.; Cibulskis, K.; Sidney, J.; *et al.* Systematic Identification of Personal Tumor-Specific Neoantigens in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **2014**, *124*, 453–462.
- (40) Fritsch, E. F.; Rajasagi, M.; Ott, P. a; Brusic, V.; Hacohen, N.; Wu, C. J. HLA-Binding Properties of Tumor Neoepitopes in Humans. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 522–529. 40
- (41) Srivastava, P. K.; Duan, F. Harnessing the Antigenic Fingerprint of Each Individual Cancer for Immunotherapy of Human Cancer: Genomics Shows a New Way and Its Challenges. *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 967–974.

- (42) Tran, E.; Turcotte, S.; Gros, A.; Robbins, P. F.; Lu, Y.; Dudley, M. E.; Parkhurst, M. R.; Yang, J. C.; Rosenberg, S. A. Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *9*, 641–645.
- (43) Matsushita, H.; Vesely, M.; Koboldt, D. Cancer Exome Analysis Reveals a T-Cell-Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* **2012**, *482*, 400–404. 10
- (44) Yadav, M.; Jhunjhunwala, S.; Phung, Q. T.; Lupardus, P.; Tanguay, J.; Bumbaca, S.; Franci, C.; Cheung, T. K.; Fritsche, J.; Weinschenk, T.; *et al.* Predicting Immunogenic Tumour Mutations by Combining Mass Spectrometry and Exome Sequencing. *Nature* **2014**, *515*, 572–576.
- (45) Gubin, M. M.; Zhang, X.; Schuster, H.; Caron, E.; Ward, J. P.; Noguchi, T.; Ivanova, Y.; Hundal, J.; Arthur, C. D.; Krebber, W.-J.; *et al.* Checkpoint Blockade Cancer Immunotherapy Targets Tumour-Specific Mutant Antigens. *Nature* **2014**, *515*, 577–581. 20
- (46) Castle, J. C.; Kreiter, S.; Diekmann, J.; Löwer, M.; van de Roemer, N.; de Graaf, J.; Selmi, A.; Diken, M.; Boegel, S.; Paret, C.; *et al.* Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1081–1091.
- (47) Kim, K.; Skora, A. D.; Li, Z.; Liu, Q.; Tam, A. J.; Blosser, R. L.; Diaz, L. a; Papadopoulos, N.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; *et al.* Eradication of Metastatic Mouse Cancers Resistant to Immune Checkpoint Blockade by Suppression of Myeloid-Derived Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 11774–11779. 30
- (48) Gulukota, K.; Sidney, J.; Sette, a; DeLisi, C. Two Complementary Methods for Predicting Peptides Binding Major Histocompatibility Complex Molecules. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 1258–1267. 40
- (49) Ernst, B.; Lee, D.; Chang, J. M.; Sprent, J.; Surh, C. D.; Cd, I. The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery. **1999**, *11*, 173–181.

- (50) Dummer, W.; Ernst, B.; Leroy, E.; Surh, C. D.; Lee, D. Autologous Regulation of Naive T Cell Homeostasis Within the T Cell Compartment. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2460–2468.
- (51) Wu, Z.; Bensinger, S. J.; Zhang, J.; Chen, C.; Yuan, X.; Huang, X.; Markmann, J. F.; Kassae, A.; Rosengard, B. R.; Hancock, W. W.; *et al.* Homeostatic Proliferation Is a Barrier to Transplantation Tolerance. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 87–92. 10
- (52) Klebanoff, C. a; Khong, H. T.; Antony, P. a; Palmer, D. C.; Restifo, N. P. Sinks, Suppressors and Antigen Presenters: How Lymphodepletion Enhances T Cell-Mediated Tumor Immunotherapy. *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 111–117.
- (53) Wrzesinski, C.; Paulos, C. M.; Kaiser, A.; Muranski, P.; Palmer, D. C.; Gattinoni, L.; Yu, Z.; Rosenberg, S. a; Restifo, N. P. Increased Intensity Lymphodepletion Enhances Tumor Treatment Efficacy of Adoptively Transferred Tumor-Specific T Cells. *J. Immunother.* **2010**, *33*, 1–7. 20
- (54) Gattinoni, L.; Finkelstein, S. E.; Klebanoff, C. a; Antony, P. a; Palmer, D. C.; Spiess, P. J.; Hwang, L. N.; Yu, Z.; Wrzesinski, C.; Heimann, D. M.; *et al.* Removal of Homeostatic Cytokine Sinks by Lymphodepletion Enhances the Efficacy of Adoptively Transferred Tumor-Specific CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 907–912. 30
- (55) Alanio, C.; Lemaitre, F.; Law, H. K. W.; Hasan, M.; Albert, M. L. Enumeration of Human Antigen-Specific Naive CD8+ T Cells Reveals Conserved Precursor Frequencies. *Blood* **2010**, *115*, 3718–3725.
- (56) Lu, X.; Jiang, X.; Liu, R.; Zhao, H.; Liang, Z. Adoptive Transfer of pTRP2-Specific CTLs Expanding by Bead-Based Artificial Antigen-Presenting Cells Mediates Anti-Melanoma Response. *Cancer Lett.* **2008**, *271*, 129–139. 40
- (57) Cobbold, M.; Khan, N.; Pourgheysari, B.; Tauro, S.; McDonald, D.; Osman, H.; Assenmacher, M.; Billingham, L.; Steward, C.; Crawley, C.; *et al.* Adoptive Transfer of Cytomegalovirus-Specific CTL to Stem Cell Transplant Patients after Selection by HLA-Peptide Tetramers. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 379–386.

- (58) Yee, C.; Savage, P. a; Lee, P. P.; Davis, M. M.; Greenberg, P. D. Isolation of High Avidity Melanoma-Reactive CTL from Heterogeneous Populations Using Peptide-MHC Tetramers. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2227–2234.
- (59) Bouquié, R.; Bonnin, A.; Bernardeau, K.; Khammari, A.; Dréno, B.; Jotereau, F.; Labarrière, N.; Lang, F. A Fast and Efficient HLA Multimer-Based Sorting Procedure That Induces Little Apoptosis to Isolate Clinical Grade Human Tumor Specific T Lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 553–566. 10
- (60) Cebecauer, M.; Guillaume, P.; Hozák, P.; Mark, S.; Everett, H.; Schneider, P.; Luescher, I. F. Soluble MHC-Peptide Complexes Induce Rapid Death of CD8+ CTL. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6809–6819.
- (61) Guillaume, P.; Legler, D. F.; Boucheron, N.; Doucey, M.-A.; Cerottini, J.-C.; Luescher, I. F. Soluble Major Histocompatibility Complex-Peptide Octamers with Impaired CD8 Binding Selectively Induce Fas-Dependent Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4500–4509. 20
- (62) Wölfl, M.; Greenberg, P. D. Antigen-Specific Activation and Cytokine-Facilitated Expansion of Naive, Human CD8+ T Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 950–966.
- (63) Mackensen, A.; Meidenbauer, N.; Vogl, S.; Laumer, M.; Berger, J.; Andreesen, R. Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen-Specific CD8+ T Cells for the Treatment of Patients with Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 5060–5069. 30
- (64) Chapuis, A.; Ragnarsson, G. Transferred WT1-Reactive CD8+ T Cells Can Mediate Antileukemic Activity and Persist in Post-Transplant Patients. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *27*.
- (65) Dudley, M. E.; Wunderlich, J.; Nishimura, M. I.; Yu, D.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Schwartzentruber, D. J.; Hwu, P.; Marincola, F. M.; Sherry, R.; *et al.* Adoptive Transfer of Cloned Melanoma-Reactive T Lymphocytes for the Treatment of Patients with Metastatic Melanoma. *J. Immunother.* **2001**, *24*, 363–373. 40

- (66) Oelke, M.; Moehrl, U.; Chen, J.; Behringer, D.; Cerundolo, V.; Lindemann, A.; Mackensen, A. Generation and Purification of CD8 + Melan-A-Specific Cytotoxic T Lymphocytes for Adoptive Transfer in Tumor Immunotherapy
Generation and Purification of CD8 \square Melan-A-Specific Cytotoxic T Lymphocytes for Adoptive Transfer in Tumor Immunotherapy 1. **2005**, 1997–2005.

【 0 1 4 7 】

実施例 2 を除く出願全体の参考文献

- (1) Restifo, N. P.; Dudley, M. E.; Rosenberg, S. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, 12, 269–281.
- (2) Dudley, M. E.; Rosenberg, S. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 666–675.
- (3) Yee, C. *Immunol. Rev.* 2014, 257, 250–263.
- (4) Itzhaki, O.; Hovav, E.; Ziporen, Y.; Levy, D.; Kubi, A.; Zikich, D.; Hershkovitz, L.; Treves, A. J.; Shalmon, B.; Zippel, D.; Markel, G.; Shapira-frommer, R.; Schachter, J.; J, M. J. B. *J Immunother.* 2011, 34, 212–220. 10
- (5) Rizzuto, G. a; Merghoub, T.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Liu, C.; Lesokhin, A. M.; Sahawneh, D.; Zhong, H.; Panageas, K. S.; Perales, M.-A.; Altan-Bonnet, G.; Wolchok, J. D.; Houghton, A. N. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 849–866.
- (6) Jenkins, M. K.; Chu, H. H.; McLachlan, J. B.; Moon, J. J. *Annu. Rev. Immunol.* 2010, 28, 275–294. 20
- (7) Jenkins, M. K.; Moon, J. J. *J. Immunol.* 2012, 188, 4135–4140.
- (8) Klebanoff, C. a; Gattinoni, L.; Palmer, D. C.; Muranski, P.; Ji, Y.; Hinrichs, C. S.; Borman, Z. a; Kerkar, S. P.; Scott, C. D.; Finkelstein, S. E.; Rosenberg, S. a; Restifo, N. P. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 5343–5352.
- (9) Wen, F.; Thisted, R. 2012, 172–178.
- (10) Besser, M. J.; Shapira-Frommer, R.; Treves, A. J.; Zippel, D.; Itzhaki, O.; Hershkovitz, L.; Levy, D.; Kubi, A.; Hovav, E.; Chermoshniuk, N.; Shalmon, B.; Hardan, I.; Catane, R.; Markel, G.; Apter, S.; Ben-Nun, A.; Kuchuk, I.; Shimoni, A.; Nagler, A.; Schachter, J. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 2646–2655. 30
- (11) Chapuis, A.; Ragnarsson, G. *Sci. Transl.*, 2013, 27.
- (12) Ernst, B.; Lee, D.; Chang, J. M.; Sprent, J.; Surh, C. D.; Cd, I. 1999, 11, 173–181.
- (13) Dummer, W.; Ernst, B.; Leroy, E.; Surh, C. D.; Lee, D. J. *Immunol.* 2001, 166, 2460–2468. 40

(14) Wu, Z.; Bensinger, S. J.; Zhang, J.; Chen, C.; Yuan, X.; Huang, X.; Markmann, J. F.; Kassace, A.; Rosengard, B. R.; Hancock, W. W.; Sayegh, M. H.; Turka, L. a. *Nat. Med.* 2004, 10, 87–92.

(15) Perica, K.; De León Medero, A.; Durai, M.; Chiu, Y. L.; Bieler, J. G.; Sibener, L.; Niemöller, M.; Assenmacher, M.; Richter, A.; Edidin, M.; Oelke, M.; Schneck, J. *Nanomedicine* 2013, 10, 119–129.

(16) Perica, K.; Tu, A.; Richter, A.; Bieler, J. G.; Edidin, M.; Schneck, J. P. *ACS Nano* 2014.

(17) Smith-Garvin, J. E.; Koretzky, G. a; Jordan, M. S. *Annu. Rev. Immunol.* 2009, 27, 591–619.

(18) Sarkar, S.; Teichgräber, V.; Kalia, V.; Polley, A.; Masopust, D.; Harrington, L. E.; Ahmed, R.; Wherry, E. J. *J. Immunol.* 2007, 179, 6704–6714.

(19) Oelke, M.; Maus, M. V; Didiano, D.; June, C. H.; Mackensen, A.; Schneck, J. P. *Nat. Med.* 2003, 9, 619–624.

(20) Seliger, B. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008, 57, 1719–1726.

(21) Kaluza, K. M.; Thompson, J. M.; Kottke, T. J.; Flynn Gilmer, H. C.; Knutson, D. L.; Vile, R. G. *Int. J. Cancer* 2012, 131, 844–854.

(22) Jensen, S. M.; Twitty, C. G.; Maston, L. D.; Antony, P. a; Lim, M.; Hu, H.-M.; Petrausch, U.; Restifo, N. P.; Fox, B. a. *J. Immunol.* 2012, 189, 767–776.

(23) Kaluza, K. M.; Kottke, T.; Diaz, R. M.; Rommelfanger, D.; Thompson, J.; Vile, R. *Hum. Gene Ther.* 2012, 23, 1054–1064.

(24) Klebanoff, C. a; Khong, H. T.; Antony, P. a; Palmer, D. C.; Restifo, N. P. *Trends Immunol.* 2005, 26, 111–117.

(25) Wrzesinski, C.; Paulos, C. M.; Kaiser, A.; Muranski, P.; Palmer, D. C.; Gattinoni, L.; Yu, Z.; Rosenberg, S. a; Restifo, N. P. *J. Immunother.* 2010, 33, 1–7.

(26) Gattinoni, L.; Finkelstein, S. E.; Klebanoff, C. a; Antony, P. a; Palmer, D. C.; Spiess, P. J.; Hwang, L. N.; Yu, Z.; Wrzesinski, C.; Heimann, D. M.; Surh, C. D.; Rosenberg, S. a; Restifo, N. P. *J. Exp. Med.* 2005, 202, 907–912.

10

20

30

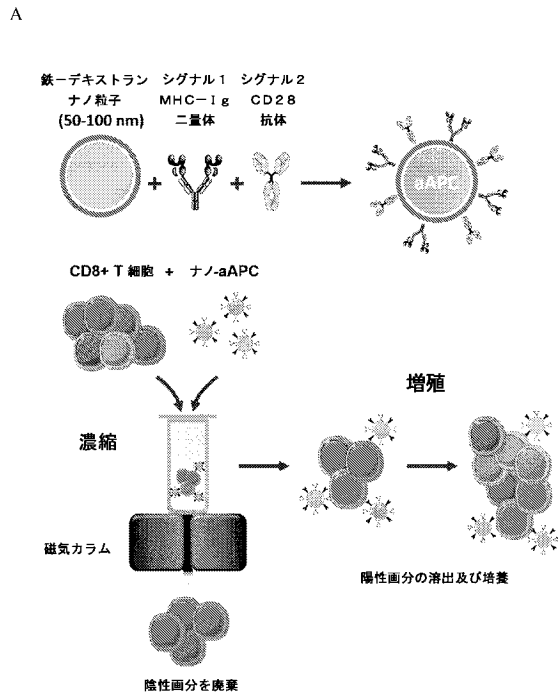
40

- (27) Alanio, C.; Lemaitre, F.; Law, H. K. W.; Hasan, M.; Albert, M. L. *Blood* 2010, 115, 3718–3725.
- (28) Lu, X.; Jiang, X.; Liu, R.; Zhao, H.; Liang, Z. *Cancer Lett.* 2008, 271, 129–139.
- (29) Cobbold, M.; Khan, N.; Pourgheysari, B.; Tauro, S.; McDonald, D.; Osman, H.; Assenmacher, M.; Billingham, L.; Steward, C.; Crawley, C.; Olavarria, E.; Goldman, J.; Chakraverty, R.; Mahendra, P.; Craddock, C.; Moss, P. a H. J. *Exp. Med.* 2005, 202, 379–386. 10
- (30) Yee, C.; Savage, P. a; Lee, P. P.; Davis, M. M.; Greenberg, P. D. J. *J. Immunol.* 1999, 162, 2227–2234.
- (31) Bouquié, R.; Bonnin, A.; Bernardeau, K.; Khammari, A.; Dréno, B.; Jotereau, F.; Labarrière, N.; Lang, F. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009, 58, 553–566.
- (32) Cebecauer, M.; Guillaume, P.; Hozák, P.; Mark, S.; Everett, H.; Schneider, P.; Luescher, I. F. J. *J. Immunol.* 2005, 174, 6809–6819. 20
- (33) Guillaume, P.; Legler, D. F.; Boucheron, N.; Doucey, M.-A.; Cerottini, J.-C.; Luescher, I. F. J. *Biol. Chem.* 2003, 278, 4500–4509.
- (34) Morgan, R. A.; Chinnasamy, N.; Abate-daga, D.; Gros, A.; Robbins, P. F.; Zheng, Z.; Dudley, M. E.; Feldman, S. A.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Phan, G. Q.; Hughes, M. S.; Kammula, U. S.; Miller, A. D.; Hessman, C. J.; Stewart, A. A.; Restifo, N. P.; Quezado, M. M.; Alimchandani, M.; Rosenberg, A. Z.; Nath, A.; Wang, T.; Bielekova, B.; Wuest, S. C.; Akula, N.; McMahon, F. J.; Wilde, S.; Mosetter, B.; Schendel, D. J.; Laurencot, C. M.; Rosenberg, S. A. J. *Immunother.* 2013, 36, 133–151. 30
- (35) Hunder, N. N.; Wallen, H.; Cao, J.; Hendricks, D. W.; Reilly, J. Z.; Rodmyre, R.; Jungbluth, A.; Gnjatic, S.; Thompson, J. a; Yee, C. N. *Engl. J. Med.* 2008, 358, 2698–2703. 40
- (36) Chapuis, A.; Ragnarsson, G. *Sci. Transl.* 2013, 27.
- (37) Mackensen, A.; Meidenbauer, N.; Vogl, S.; Laumer, M.; Berger, J.; Andreesen, R. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 5060–5069.

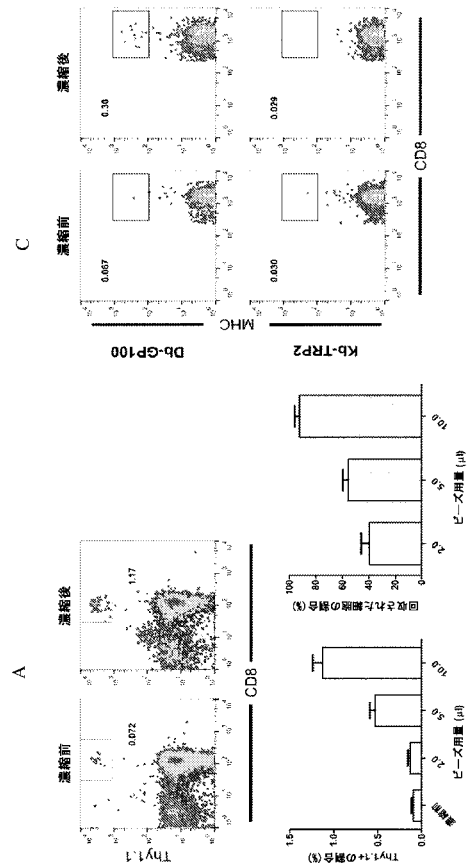
(38) Dudley, M. E.; Wunderlich, J.; Nishimura, M. I.; Yu, D.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Schwartzentruber, D. J.; Hwu, P.; Marincola, F. M.; Sherry, R.; Leitman, S. F.; Rosenberg, S. a. *J. Immunother.* 2001, 24, 363–373.

(39) Wölfl, M.; Greenberg, P. D. *Nat. Protoc.* 2014, 9, 950–966.

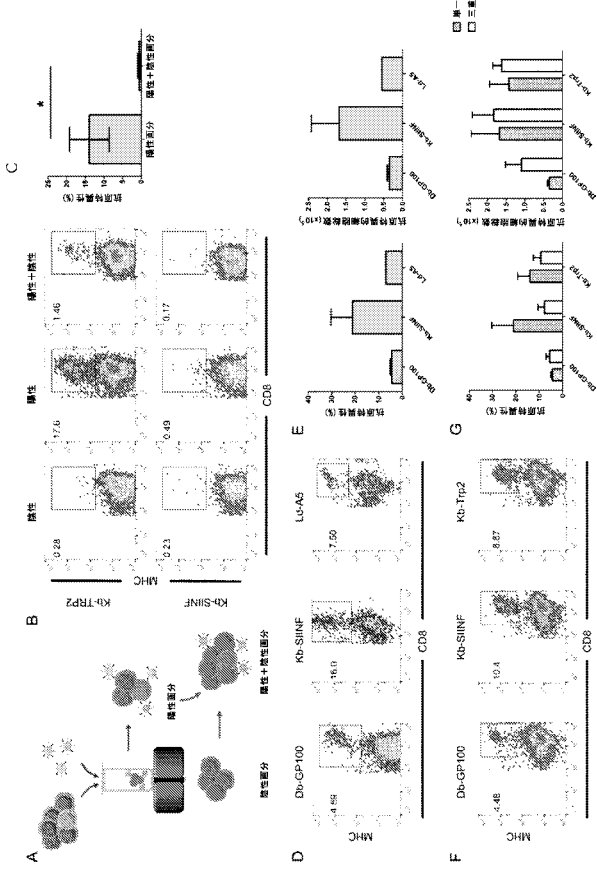
【図 1】



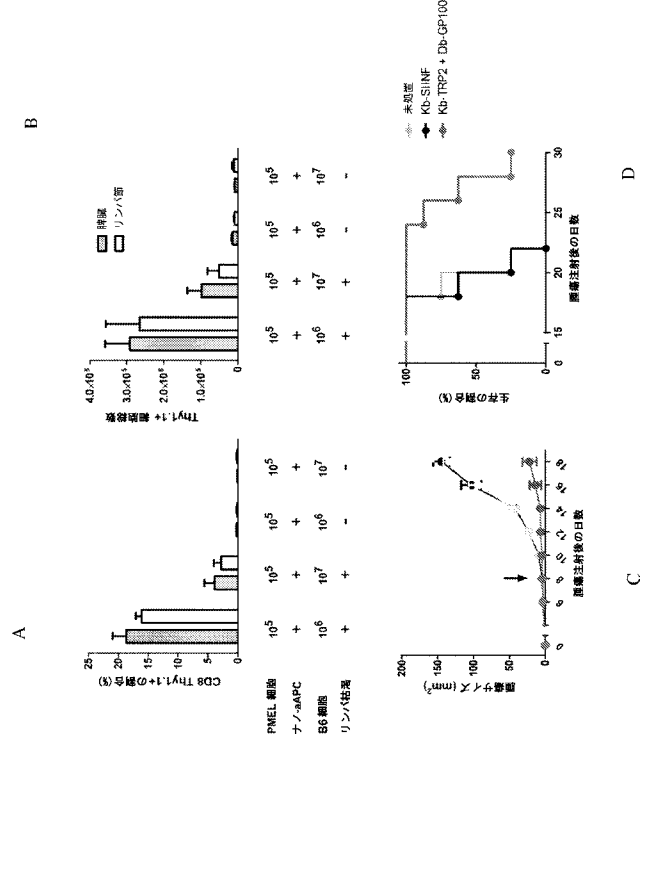
【図 2】



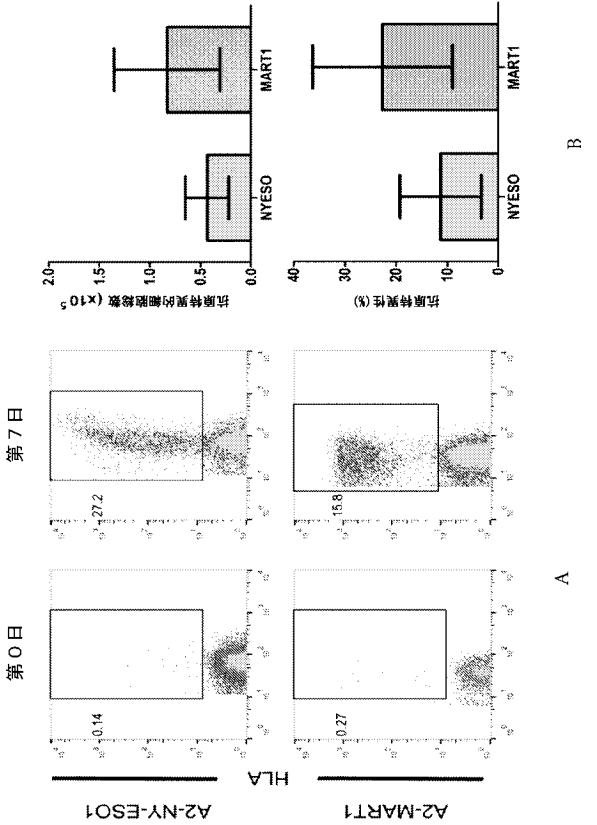
【図3】



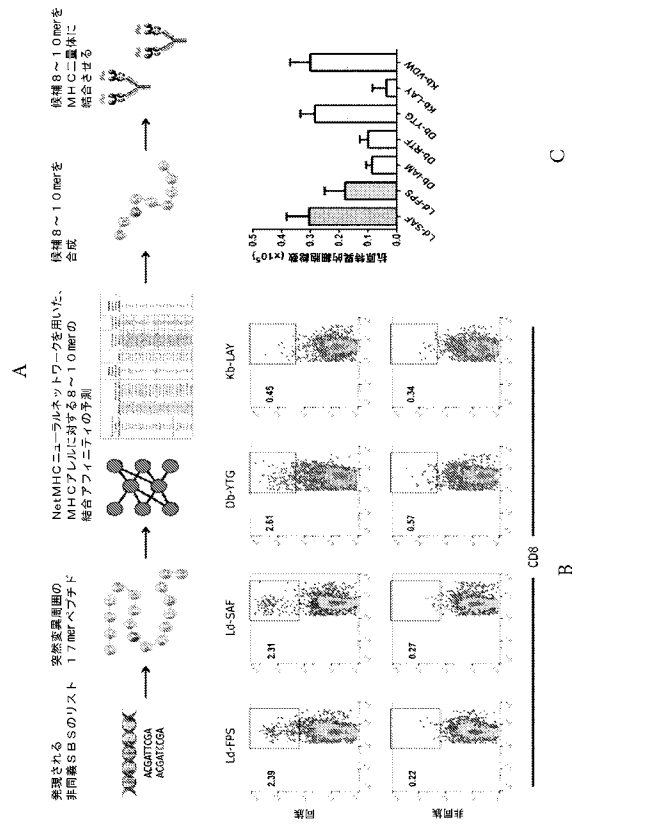
【図4】



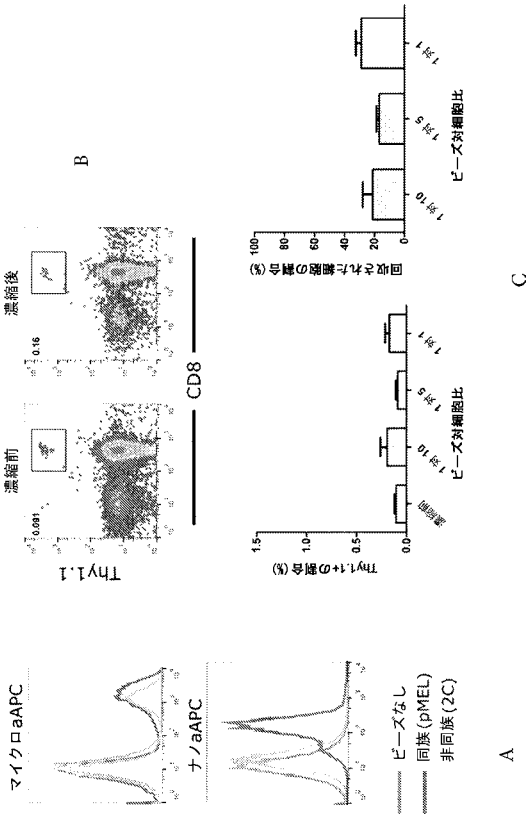
【図5】



【図6】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/050593
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i, C12N 13/00(2006.01)i, C07K 16/30(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, B03C 1/00(2006.01)j		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0783; A61K 39/395; A61K 35/12; C12N 5/08; A61K 48/00; A61K 38/19; C12Q 1/68; C12N 13/00; C07K 16/30; G01N 33/574; B03C 1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: antigen-specific T-cell, paramagnetic particle, cancer, immunotherapy, antigen		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERICA, KARLO et al., 'Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity', ACS Nano, Epub. 24 February 2014, Vol. 8, No. 3, pp. 2252-2260. See abstract; page 2252, left column, paragraph 2; page 2253, left column, paragraphs 1-3; page 2256, right column, paragraph 5; page 2258, right column, paragraph 3; methods; figure 1.	1-18,38,59,61 ,63-64,68,79,82
Y		49-52,56-57,67,78 ,83
Y	US 2011-0293637 A1 (HACOHEN, NIR et al.) 1 December 2011 See abstract; paragraph [0088]; claims 1 and 9.	67,78
Y	US 2002-0131960 A1 (SADELAIN, MICHEL et al.) 19 September 2002 See abstract; claims 3, 49 and 53.	49-52,56-57,83
A	US 2010-0284965 A1 (FAHMY, TAREK et al.) 11 November 2010 See claims 19, 31 and 35.	1-18,38,49-52 ,56-57,59,61,63-64 ,67-68,78-79,82-83
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 31 December 2015 (31.12.2015)		Date of mailing of the international search report 31 December 2015 (31.12.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/050593

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERICA, KARLO et al., 'Nanoscale artificial antigen presenting cells for T cell immunotherapy', <i>Nanomedicine</i> , Epub, 24 July 2013, Vol. 10, No. 1, pp. 119-129. See the whole document.	1-18, 38, 49-52 , 56-57, 59, 61, 63-64 , 67-68, 78-79, 82-83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/050593

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

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

1. Claims Nos.: 62,69-70,77
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 62, 69-70 and 77 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.: 22-24,26,28-30,32,41-43,46-48,58,60,65,71-75,80
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 22-24, 26, 28-30, 32, 41-43, 46-48, 58, 60, 65, 71-75 and 80 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: 19-21,25,27,31,33-37,39-40,44-45,53-55,66,76,81
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/050593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0293637 A1	01/12/2011	AU 2011-252795 A1 AU 2011-252795 B2 CA 2797868 A1 CN 103180730 A EP 2569633 A2 EP 2569633 A4 JP 2013-530943 A KR 10-2013-0119845 A US 9115402 B2 WO 2011-143656 A2 WO 2011-143656 A3	08/11/2012 03/09/2015 17/11/2011 26/06/2013 20/03/2013 14/05/2014 01/08/2013 01/11/2013 25/08/2015 17/11/2011 23/08/2012
US 2002-0131960 A1	19/09/2002	AU 6534601 A CA 2410510 A1 EP 1287357 A2 WO 01-94944 A2 WO 01-94944 A3	17/12/2001 13/12/2001 05/03/2003 13/12/2001 22/08/2002
US 2010-0284965 A1	11/11/2010	US 8629098 B2 WO 2009-094273 A2 WO 2009-094273 A3	14/01/2014 30/07/2009 14/01/2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01) G 0 1 N 33/577 B

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

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シュネック ジョナサン
 アメリカ合衆国 2 0 9 0 2 メリーランド州 シルバー スプリング イェトマン コート 5

(72)発明者 ペリカ カルロ
 アメリカ合衆国 2 1 2 0 2 メリーランド州 ボルチモア ノース チャールズ ストリート
 1 2 0 9 アパートメント 2 2 1

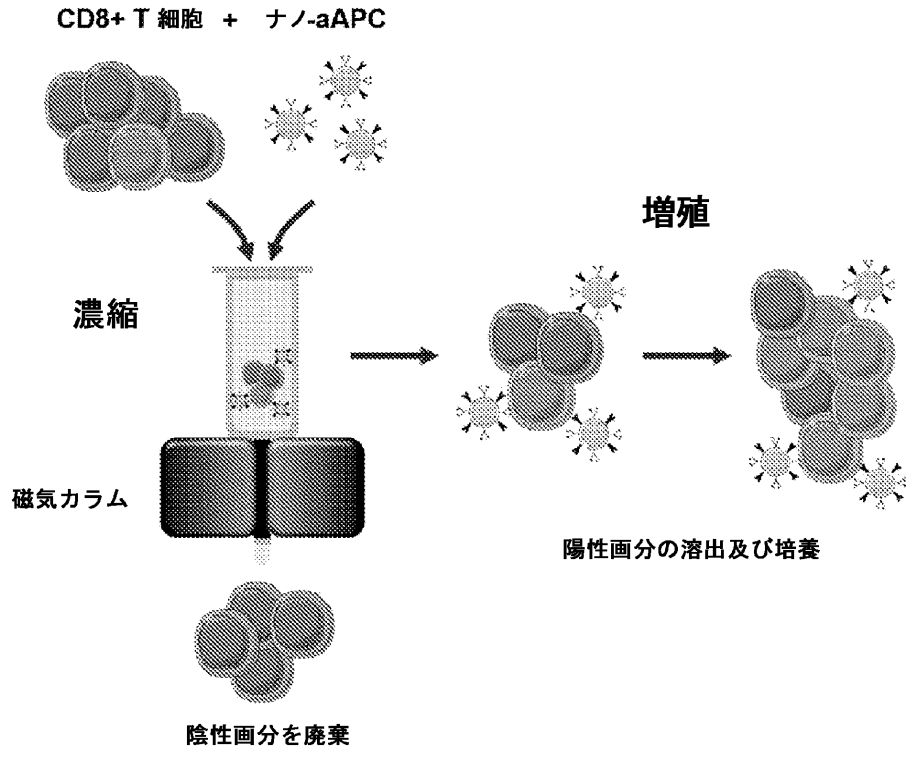
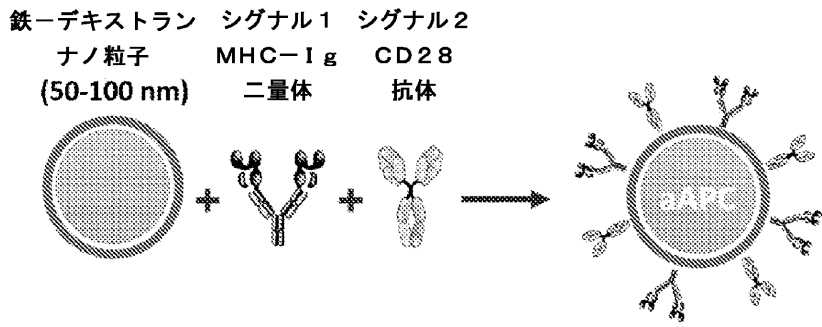
(72)発明者 グリック ビーラー ジョアン
 アメリカ合衆国 2 0 9 0 2 メリーランド州 シルバー スプリング ウィノナ コート 6 0
 9

(72)発明者 エールケ マチアス
 アメリカ合衆国 2 1 2 3 4 メリーランド州 パークビル ウィルソン アベニュー 7 8 1 2

Fターム(参考) 2G045 AA02 AA03 AA24 AA26 AA40 BA13 BB13 BB20 BB24 CA02
 CA11 CA17 CA18 CA19 CA21 CA22 CA23 CA24 CA25 CB21
 DA14 DA20 DA36 FA37 FB03 FB12 GC15
 4B063 QA01 QA05 QA17 QQ08 QQ79 QR48 QR50 QS33
 4B065 AA91X AA93X BA21 BD22 BD38 BD39 CA44

【要約の続き】

A



B

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017529080A5	公开(公告)日	2018-10-25
申请号	JP2017515062	申请日	2015-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	シュネックジョナサン ペリカカル口 グリックビーラージョアン エールケマチアス		
发明人	シュネック ジョナサン ペリカ カル口 グリック ビーラー ジョアン エールケ マチアス		
IPC分类号	C12N5/0783 C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/577		
CPC分类号	A61K35/17 B03C1/01 B03C1/288 B03C2201/18 B03C2201/26 C07K16/00 C07K16/2818 C07K2317/622 C07K2317/75 C07K2319/33 C12N5/0638 C12N13/00 G01N33/54326 A61K39/07 A61K2039/5154 A61K2039/5158 A61K2039/585 A61P35/00 A61P37/02 A61K2300/00 A61K39/00 A61K39/0011 A61K2039/572 B03C2201/20 C12N5/0637 G01N33/5011 G01N33/505 G01N33/56972 G01N2333/70539		
FI分类号	C12N5/0783 C12Q1/02 G01N33/48.P G01N33/53.K G01N33/553 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA03 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB13 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA02 2G045/CA11 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA21 2G045/CA22 2G045/CA23 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/CB21 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QS33 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/BA21 4B065/BD22 4B065/BD38 4B065/BD39 4B065/CA44		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/051660 2014-09-17 US 62/170541 2015-06-03 US		
其他公开文献	JP2017529080A		

摘要(译)

包括幼稚T细胞和稀有前体细胞在内的抗原特异性T细胞在培养中富集并扩增。富集和扩增为通过过继转移提供更有效的免疫疗法提供了平台，并通过确定与候选肽抗原库的T细胞反应性为个性化免疫疗法提供了平台。

