(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-528534
(P2024-528534A)
(43)公表日　令和6年7月30日(2024.7.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｑ	*1/686(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/686	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	

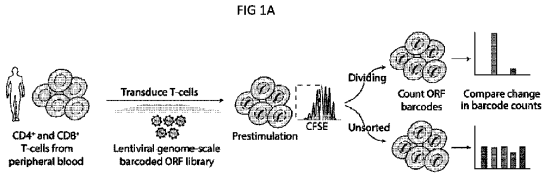
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全167頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-580680(P2023-580680)
(86)(22)出願日　令和4年6月30日(2022.6.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月28日(2024.2.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/073294
(87)国際公開番号　WO2023/279049
(87)国際公開日　令和5年1月5日(2023.1.5)
(31)優先権主張番号　63/217,014
(32)優先日　令和3年6月30日(2021.6.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/287,389
(32)優先日　令和3年12月8日(2021.12.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/320,101
最終頁に続く

(71)出願人　523333401
ニューヨーク・ゲノム・センター，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国ニューヨーク州１００１３ニューヨーク・セブンスフロアー・アベニューオブジアメリカス１０１
(71)出願人　511060836
ニューヨーク・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク ワシントン スクエア サウス ７０
(74)代理人　110000741
弁理士法人小田島特許事務所
(72)発明者　サンジャナ，ネビル・イー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１００１２ニューヨーク・アパートメント１６エ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　改善した免疫療法のための方法及び組成物

(57)【要約】
本明細書において、表１の遺伝子をコードする配列を含む核酸、発現カセット、改変リンパ球、及びそれらを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。特定の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞である。特定の実施形態では、細胞は、ＣＡＲ又は操作されたＴＣＲを更に含む。提供された組成物を使用する治療の方法も記載される。
【選択図】図１Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＬＴＢＲをコードする外因性核酸を含む、改変リンパ球。
【請求項２】
ＬＴＢＲをコードする前記核酸が、細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、請求項１に記載の改変リンパ球。
【請求項３】
ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断片、欠失、若しくはバリアントを含む、請求項２に記載の改変リンパ球。
【請求項４】
前記ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５に欠失を有する、請求項２又は３に記載の改変リンパ球。
【請求項５】
前記リンパ球が、発現制御配列と、ＬＴＢＲをコードする前記核酸と、を含む発現カセットを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項６】
前記リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項７】
前記リンパ球が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項１又は５に記載の改変リンパ球。
【請求項８】
ＬＴＢＲをコードする前記外因性核酸が、ｍＲＮＡである、請求項１に記載の改変リンパ球。
【請求項９】
前記リンパ球が、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又はＮＫ　Ｔ細胞である、請求項１～８のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項１０】
前記ＣＡＲが、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ａｘｉｃａｂｔａｇｅｎｅ　ｃｉｌｏｌｅｕｃｅｌ）（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｂｒｅｘｕｃａｂｔａｇｅｎｅ　ａｕｔｏｌｅｕｃｅｌ）（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（Ｉｄｅｃａｂｔａｇｅｎｅ　ｖｉｃｌｅｕｃｅｌ）（Ａｂｅｃｍａ（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｌｉｓｏｃａｂｔａｇｅｎｅ　ｍａｒａｌｅｕｃｅｌ）（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標））、チサゲンレクルユーセル（Ｔｉｓａｇｅｎｌｅｃｌｅｕｃｅｌ）（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、又は図１９に見出されるもののうちの１つである、請求項６又は８に記載の改変リンパ球。
【請求項１１】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
【請求項１２】
Ｔ細胞受容体をコードする核酸、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
【請求項１３】
ウイルスタンパク質をコードする核酸、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
【請求項１４】
ＬＴＢＲをコードする前記核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の発現カセット。
【請求項１５】
改変リンパ球を産生する方法であって、ＬＴＢＲをコードする外因性核酸を細胞に導入

することを含む、方法。
【請求項１６】
ＬＴＢＲをコードする前記核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項１５又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記リンパ球が、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項１～１０のいずれか一項に記載の改変リンパ球又は請求項１１～１４のいずれか一項に記載の発現カセットを投与することを含む、方法。
【請求項２０】
ウイルス性疾患の打ち負かしを必要とする対象におけるウイルス性疾患を打ち負かす方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物又は請求項１１～１４のいずれか一項に記載の発現カセットを投与することを含む、方法。
【請求項２１】
自己免疫障害の治療を必要とする対象における自己免疫障害を治療する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項１～１０のいずれか一項に記載の改変リンパ球又は請求項１１～１４のいずれか一項に記載の発現カセットを投与することを含む、方法。
【請求項２２】
増殖、又はサイトカイン産生及び／若しくは分泌を含むＴ細胞エフェクター機能を増加させる方法であって、前記方法が、前記Ｔ細胞に、請求項１ａ～１４のいずれか一項に記載の発現カセットを導入することを含む、方法。
【請求項２３】
前記Ｔ細胞が、前記Ｔ細胞を打ち負かしてＬＴＢＲを過剰発現させる前にヒトから得られ、前記打ち負かされたＴ細胞がヒトに再導入される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
ワクチン組成物に対する応答を増加させる方法であって、対象に、ＬＴＢＲをコードする核酸を含むワクチンを共投与することを含む、方法。
【請求項２５】
ＬＴＢＲをコードする前記核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
ＬＴＢＲの発現が、一過性である、請求項２４又は２５に記載の方法。
【請求項２７】
表１の遺伝子をコードする外因性核酸を含む、改変リンパ球。
【請求項２８】
前記リンパ球が、発現制御配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットを含む、請求項２７に記載の改変リンパ球。
【請求項２９】
前記リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項２７又は２８に記載の改変リンパ球。
【請求項３０】
前記リンパ球が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、請求項２７又は２８に記載の改変リンパ球。
【請求項３１】
キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列及び表１の遺伝子をコードする核酸を

含む、発現カセット。
【請求項３２】
Ｔ細胞受容体をコードする核酸及び表１の遺伝子をコードする核酸を含む、発現カセット。
【請求項３３】
ウイルスタンパク質をコードする核酸及び表１の遺伝子をコードする核酸を含む、発現カセット。
【請求項３４】
請求項３１～３３のいずれか一項に記載の発現カセットを含む改変リンパ球を含む、組成物。
【請求項３５】
前記リンパ球に、表１の遺伝子をコードする外因性核酸を導入することを含む、改変リンパ球を産生する、方法。
【請求項３６】
がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項２７～３０のいずれか一項に記載の改変リンパ球、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の発現カセット、又は請求項３４に記載の組成物を投与することを含む、方法。
【請求項３７】
表１の前記遺伝子が、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である、請求項２７～３６のいずれか一項に記載の改変リンパ球、組成物、発現カセット、又は方法。
【請求項３８】
改変リンパ球において外因的に発現されるとき、前記改変リンパ球の治療機能を変化させる遺伝子を特定する方法であって、前記方法が、
（ａ）リンパ球集団を得ることと、
（ｂ）各ウイルスベクターが、１つ以上のバーコードに連結され得る遺伝子をコードする、複数のウイルスベクターで前記リンパ球集団を形質導入することと、
（ｃ）前記形質導入したリンパ球を刺激して、活性化、増殖、及び／又はエフェクター機能を誘導することと、
（ｄ）（ｃ）の前記リンパ球集団から形質導入したリンパ球を単離することと、
（ｅ）前記単離されたリンパ球における前記遺伝子及び／又は前記連結されたバーコードの存在を検出することと、を含み、
前記検出された遺伝子が、前記遺伝子を発現する改変リンパ球の前記治療機能を変化させるのに有効である、方法。
【請求項３９】
前記遺伝子が、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）又は非コードＲＮＡ、任意選択的に、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）若しくは長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ、長ｎｃＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記リンパ球集団が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又はそれらの亜集団のうちの１つ以上について濃縮されており、任意選択的に、前記細胞がヒトである、細胞集団を含む、請求項３８又は３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記リンパ球集団が、ＣＡＲ　Ｔ細胞を含む、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記リンパ球集団が、その表面に発現された操作されたＴＣＲを含むリンパ球を含む、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】
前記複数のウイルスベクターが、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のライブラリを含む、請求項３８～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
（ｅ）が、前記単離されたリンパ球、並びに前記遺伝子及び／又はバーコード配列のＰＣＲ増幅から、ゲノムＤＮＡを得ることを含む、請求項３８～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
（ｅ）が、単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む、請求項３８～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
個々の細胞に対する目的のＯＲＦの過剰発現の効果を分析する方法であって、
（ａ）前記目的のＯＲＦをコードする核酸を含む発現カセットを前記細胞に導入し、前記ＯＲＦを過剰発現させることと、
（ｂ）前記個々の細胞に由来する第１のセットの核酸及び第１のバーコード配列を有する第１のオリゴヌクレオチドを別個の分画に提供することであって、前記オリゴヌクレオチドがビーズに結合されており、前記第１のセットの核酸が内因性トランスクリプトームｍＲＮＡ及びＯＲＦ　ｍＲＮＡを含む、提供することと、
（ｃ）ＲＴ－ＰＣＲを行って、前記第１のセットの核酸に由来する第２のセットの核酸を生成することであって、前記分画内の前記第２のセットの核酸が、それらに第１の核酸バーコード配列を含む第１のオリゴヌクレオチドを結合させており、前記ＲＴ－ＰＣＲが、ポリＡ配列ではない前記ＯＲＦ　ｍＲＮＡ上の配列に特異的にアニーリングするプライマーを含むＲＴ－ＰＣＲ試薬を使用して行われ、前記第２のセットの核酸が、内因性トランスクリプトームｃＤＮＡ及びＯＲＦ　ｃＤＮＡを含む、生成することと、
（ｄ）ポリＡ配列ではない前記ＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第２のプライマーを含むＰＣＲ試薬を使用して、前記第２のセットの核酸を増幅させて、第３のセットの核酸を生成することと、
（ｅ）前記バーコード配列、トランスクリプトームｃＤＮＡ、及び／又はＯＲＦ　ｃＤＮＡを検出すること及び／又は配列決定することと、を含む、方法。
【請求項４７】
（ｄ’）前記第３のセットの核酸の一部を得ることと、ポリＡ配列ではない前記ＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第３のプライマーを含む第２のセットのＰＣＲ試薬を使用して、前記ＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて、第４のセットの核酸を生成することと、を更に含む、請求項１４６に記載の方法。
【請求項４８】
（ｄ”）ポリＡ配列ではない前記ＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第４のプライマーを含む第３のセットのＰＣＲ試薬を使用して、前記第４のセットの核酸における前記ＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて、第５のセットの核酸を生成することを更に含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
（ａ）の前記細胞を、前記第１のオリゴヌクレオチドに結合した抗体又は抗体断片を含む構築物と接触させることを更に含む、請求項４６～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む、請求項４６～４９のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
政府支援に関する記述
本発明は、米国国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈ

ｅａｌｔｈ）によって授与されたＲ００ＨＧ００８１７１、ＤＰ２ＨＧ０１００９９、及びＲ０１ＣＡ２１８６６８、並びに米国国防総省国防高等研究事業局（Ｄｅｆｅｎｓｅ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ Ａｇｅｎｃｙ）によって授与されたＤ１８ＡＰ００００５３の下で政府の支援で行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【０００２】

選択した腫瘍抗原に対して再指向される遺伝子操作された自己患者Ｔ細胞を用いた細胞免疫療法は、血液がんに対して大きな有効性をもたらし、これまでに米国食品医薬品局（ＵＳ Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）（ＦＤＡ）によるキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）に関する５件の承認をもたらした[6]。対照的に、固形腫瘍に対するＣＡＲ療法は、腫瘍微小環境におけるＴ細胞エフェクター機能の抑制のために、全体的にはるかに低い有効性を示した。血液悪性腫瘍についてさえ、Ｂ急性リンパ芽球性白血病を除いて、ほとんどの患者は持続的な応答を経験せず、抵抗性は、抗原損失ではなくＴ細胞機能障害に主に起因している[7]。Ｔ細胞機能不全に関与する遺伝子及び経路を特定するためにかなりの努力が払われてきている[8、9]。しかしながら、これまでのところ、Ｔ細胞機能の調節因子についての包括的なゲノム全体のスクリーニングは、機能喪失スクリーニングに限定されている[2～4]。

【０００３】

ＣＲＩＳＰＲゲノム工学における進歩は、スケーラブル及びカスタマイズ可能な手段でゲノム内の全ての遺伝子を容易にノックアウトすることを可能にしている。その大きなサイズは、レンチウイルスを介して初代Ｔ細胞にＣａｓ９を送達することを困難にするが（たとえ不可能ではないにしても[10]）、代替的なアプローチが開発されており、これは、Ｃａｓ９タンパク質[2]若しくはｍＲＮＡ[11]の一過性送達、又は操作された同質遺伝子マウス系統における構成的なＣａｓ９発現[3]に依存する。しかしながら、これらのアプローチは、標的遺伝子発現を駆動する転写活性化因子の連続的な発現を必要とする、ヒト細胞における機能獲得スクリーニングを受け入れることができない。

【０００４】

必要とされるのは、より効果的な免疫療法のための改善された組成物及び方法である。

【発明の概要】

【０００５】

一態様では、表１の遺伝子をコードする外因性核酸を含む改変リンパ球が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ ＣＡＬＭＬ３ ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【０００６】

一実施形態では、リンパ球は、発現制御配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットを含む。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ ＣＡＬＭＬ３ ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【０００７】

特定の実施形態では、リンパ球は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ａｘｉｃａｂｔａｇｅｎｅ ｃｉｌｏｌｅｕｃｅｌ）（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｂｒｅｘｕｃａｂｔａｇｅｎｅ ａｕｔｏｌｅｕｃｅｌ）（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（Ｉｄｅｃａｂｔａｇｅｎｅ ｖｉｃｌｅｕｃｅｌ）（Ａｂｅｃｍａ（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｌｉｓｏｃａｂｔａｇｅｎｅ ｍａｒａｌｅｕｃｅｌ）（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標）

）、チサゲンレクルユーセル（Ｔｉｓａｇｅｎｌｅｃｌｅｕｃｅｌ）（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、又は図１９に見出されるもののうちの１つである。特定の実施形態では、ＣＡＲは、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）である。特定の実施形態では、リンパ球は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む。特定の実施形態では、ＴＣＲは、図１７に見出されるものから選択される。特定の実施形態では、リンパ球は、Ｔ細胞である。

【０００８】

別の態様では、表１の遺伝子をコードする核酸と、ウイルスタンパク質をコードする核酸と、を含むワクチン組成物が提供される。特定の実施形態では、ウイルスタンパク質は、糖タンパク質である。特定の実施形態では、糖タンパク質は、ウイルススパイクタンパク質、任意選択的にコロナウイルススパイクタンパク質である。特定の実施形態では、表１の遺伝子をコードする核酸は、ｍＲＮＡであるか、若しくはウイルススパイクタンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであるか、又はその両方である。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【０００９】

別の態様では、キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットが提供される。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【００１０】

別の態様では、Ｔ細胞受容体をコードする核酸と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットが提供される。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【００１１】

別の態様では、ウイルスタンパク質をコードする核酸と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む、発現カセットが提供される。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【００１２】

別の態様では、表１の遺伝子をコードする外因性核酸を細胞に導入することを含む、改変リンパ球を産生する方法が提供される。特定の実施形態では、リンパ球は、発現制御配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む、発現カセットを含む。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。特定の実施形態では、リンパ球は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む。他の実施形態では、リンパ球は、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む。

【００１３】

別の態様では、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法が提供される。方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される組成物を投与することを含む。特定の実施形態では、対象は、固形腫瘍を有する。特定の実施形態では、対象は、リンパ腫、任意選択的に、Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、又はマントル細胞リンパ腫を有

する。特定の実施形態では、対象は、白血病を有する。特定の実施形態では、対象は、多発性骨髄腫を有する。特定の実施形態では、対象は、ウイルス駆動がん、任意選択的に、バーキットリンパ腫、肝臓がん、カポジ肉腫、子宮頸がん、頭部がん、頸部がん、肛門がん、口腔がん、咽頭がん、陰茎がん、成人Ｔ細胞リンパ腫、又はメルケル細胞がんを有する。

【００１４】

別の態様では、ウイルス性疾患の治療を必要とする対象におけるウイルス性疾患を治療する方法が提供される。方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される組成物を投与することを含む。特定の実施形態では、疾患は、ＨＩＶである。特定の実施形態では、疾患は、ＨＰＶである。特定の実施形態では、疾患は、自己免疫障害である。

【００１５】

別の態様では、自己免疫疾患の治療を必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法が提供される。方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される組成物を投与することを含む。

【００１６】

別の態様では、増殖、又はサイトカイン産生及び／若しくは分泌を含むＴ細胞エフェクター機能を増加させる方法であって、方法は、本明細書に記載の組成物をＴ細胞に投与することを含む、方法。特定の態様では、Ｔ細胞は、Ｔ細胞を処理して表１の遺伝子を過剰発現させる前にヒトから得られ、処理したＴ細胞は、ヒトに再導入される。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【００１７】

別の態様では、ワクチン組成物に対する応答を増加させる方法が提供される。方法は、表１の遺伝子をコードする核酸をワクチンと共投与することを含む。特定の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲである。他の実施形態では、遺伝子は、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である。

【００１８】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかの特定の実施形態では、表１の遺伝子の発現は、一過性である。

【００１９】

別の態様では、改変リンパ球において外因的に発現されるとき、改変リンパ球の治療機能を変化させる遺伝子を特定する方法が提供される。方法は、（ａ）リンパ球集団を得ることと、（ｂ）各ウイルスベクターが、１つ以上のバーコードに連結され得る遺伝子をコードする、複数のウイルスベクターで前記リンパ球集団を形質導入することと、（ｃ）形質導入したリンパ球を刺激して、活性化、増殖、及び／又はエフェクター機能を誘導することと、（ｄ）（ｃ）のリンパ球集団から形質導入したリンパ球を単離することと、（ｅ）単離されたリンパ球における遺伝子及び／又は連結されたバーコードの存在を検出することと、を含み、検出された遺伝子は、遺伝子を発現する改変リンパ球の治療機能を変化させるのに有効である。特定の実施形態では、遺伝子は、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、又は非コードＲＮＡ、任意選択的にマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）若しくは長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ、長ｎｃＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列である。特定の実施形態では、リンパ球集団は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又はそれらの亜集団のうちの１つ以上について濃縮されている細胞集団を含み、任意選択的に、細胞はヒトである。特定の実施形態では、複数のウイルスベクターは、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のライブラリを含む。特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターである。特定の実施形態では

、形質導入したリンパ球を刺激することは、リンパ球を抗体、サイトカイン、抗原、超抗原、抗原提示細胞、がん細胞、及びがん細胞株のうちの１つ以上とともに培養することを含む。特定の実施形態では、形質導入リンパ球の刺激は、ＴＣＲ刺激を含み、任意選択的に、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激を含む。特定の実施形態では、方法は、形質導入したリンパ球を細胞増殖色素で標識することと、子孫細胞を単離することと、を更に含む。特定の実施形態では、ステップ（ｄ）は、１つ以上の細胞表面マーカー及び／又は１つ以上のエフェクター機能及び／又は１つ以上の分泌サイトカインを発現する細胞を特定することを含む。特定の実施形態では、ステップ（ｅ）は、単離したリンパ球、並びに遺伝子及び／又はバーコード配列のＰＣＲ増幅からゲノムＤＮＡを得ることを含む。特定の実施形態では、ステップ（ｅ）は、単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む。特定の実施形態では、（ｅ）は、フローサイトメトリー分析、細胞ハッシング、単一細胞配列決定分析、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ、ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ、又はトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）を含む。

【００２０】

別の態様では、個々の細胞に対する目的のＯＲＦの過剰発現の効果を分析する方法が提供される。方法は、（ａ）目的のＯＲＦをコードする核酸を含む発現カセットを細胞に導入し、当該ＯＲＦを過剰発現させることと、（ｂ）個々の細胞に由来する第１のセットの核酸及び共通のバーコード配列を有するオリゴヌクレオチドを別個の分画に提供することであって、オリゴヌクレオチドがビーズに放出可能に結合され、第１のセットの核酸が内因性トランスクリプトームｍＲＮＡ及びＯＲＦ　ｍＲＮＡを含む、提供することと、（ｃ）ＲＴ－ＰＣＲを行って、第１のセットの核酸に由来する第２のセットの核酸を生成することであって、分画内の当該第２のセットの核酸が、そこに共通核酸バーコード配列を含むオリゴヌクレオチド配列を結合しており、ＲＴ－ＰＣＲが、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｍＲＮＡ上の配列に特異的にアニーリングするプライマーを含むＲＴ－ＰＣＲ試薬を使用して行われ、第２のセットの核酸セットが、内因性トランスクリプトームｃＤＮＡ及びＯＲＦ　ｃＤＮＡを含む、生成することと、（ｄ）第２のセットの核酸を、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第２のプライマーを含むＰＣＲ試薬を使用して増幅させて第３のセットの核酸を生成することと、（ｅ）バーコード配列、トランスクリプトームｃＤＮＡ、及び／又はＯＲＦ　ｃＤＮＡを検出及び／又は配列決定することと、を含む。特定の実施形態では、ステップ（ｅ）は、単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む。特定の実施形態では、（ｅ）は、フローサイトメトリー分析、細胞ハッシング、単一細胞配列決定分析、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ、ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ、又はトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）を含む。

【００２１】

特定の実施形態では、方法は、第３のセットの核酸の一部を得ることと、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第３のプライマーを含む第２のセットのＰＣＲ試薬を使用してＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて、第４のセットの核酸を生成することと、を含む。

【００２２】

特定の実施形態では、方法は、をポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第４のプライマー含む第３のセットのＰＣＲ試薬を使用して、第４のセットの核酸におけるＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて、第５のセットの核酸を生成することを含み、ステップ（ｅ）は、当該第３のセット及び当該第５のセットの核酸を断片化することと、アダプターを末端に連結することと、ＮＧＳに供することと、を含む。

【００２３】

本発明の他の態様及び利点は、以下の発明の詳細な説明から容易に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１Ａ】初代ヒトＴ細胞の増殖を促進する遺伝子を特定する、ゲノムスケールの過剰発現スクリーニングを示す。プールしたＯＲＦスクリーニングの概要。ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を、３名の健常なドナーからの末梢血から別々に単離した。次いで、バーコード化ゲノムスケールＯＲＦライブラリを、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激したＴ細胞に導入し、続いて、形質導入細胞を選択した。培養の１４日後、Ｔ細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（ＣＦＳＥ）で標識し、再刺激して増殖を誘導した。細胞選別の前と後とで特定のＯＲＦバーコードの数を比較することによって、ＣＦＳＥ低集団で濃縮したＯＲＦを特定した。これらの遺伝子には、ＬＴＢＲ、ＶＳＴＭ１、ＣＤ５９、ＩＬ１２Ｂ、１Ｌ２３Ａ、ＭＡＰＫ３、ＡＤＡ、及びＤＢＩが含まれた。
【図１Ｂ】初代ヒトＴ細胞の増殖を促進する遺伝子を特定する、ゲノムスケールの過剰発現スクリーニングを示す。各遺伝子における個々のバーコードの一貫した濃縮に基づいて、ＣＦＳＥ^{低}ＣＤ４$^{+}$及びＣＦＳＥ^{低}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方における遺伝子のロバストランク集計が示される。
【図２Ａ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。スクリーニングに関係しないドナーからのＣＤ４＋及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を別々に単離し、次いで、選択マーカーとともにトップランクのＯＲＦをコードするレンチウイルスで形質導入した。形質導入及び選択の後、Ｔ細胞を、増殖、活性化マーカーの発現、及びサイトカイン分泌の測定の前に再刺激した。
【図２Ｂ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。ｔＮＧＦＲに対して正規化された、対応する非刺激対照に対する刺激した細胞の比として定義される相対増殖としての、トップランクの遺伝子で形質導入されたＴ細胞の増殖。最小２名のドナーを、過剰発現した遺伝子毎に、生物学的に三重で試験した。箱は、２５～７５パーセンタイルを平均のラインとともに示し、ひげは最大値及び最小値まで伸びている。ＤＵＰＤ１は、ＤＵＳＰ２９としても知られている。
【図２Ｃ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。ｔＮＧＦＲに対して正規化した、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるＯＲＦ形質導入Ｔ細胞の平均相対増殖。両方のＴ細胞サブセット又はそれらのいずれかにおける有意な遺伝子がマークされる（スチューデントの両側ｔ検定Ｐ＜０．０５及び偽発見率＜０．１）。
【図２Ｄ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。再刺激後のＣＤ２５又はＣＤ１５４の代表的な発現。ヒストグラム上の数字は、ゲーティングされた細胞のパーセンテージ（ＣＤ８$^{+}$ＣＤ１５４$^{+}$）又は平均蛍光強度（ＭＦＩ）に対応する。破線は、ＣＤ１５４$^{+}$細胞（ＣＤ８$^{+}$）又は対照（ｔＮＧＦＲ）細胞のＭＦＩを列挙するために使用されたゲートを示す。
【図２Ｅ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。ｔＮＧＦＲに対して正規化した、再刺激後のＩＬ－２及びＩＦＮγの分泌。ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$、又は両方のＴ細胞サブセットにおけるＴ細胞増殖を有意に増加させる遺伝子のみが示される。最小２名のドナーを、遺伝子当たり三重で試験した。箱は、２５～７５パーセンタイルを平均のラインとともに示し、ひげは最大値と最小値まで伸びている。
【図２Ｆ】トップランクのＯＲＦの過剰発現が、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖、活性化、及びサイトカイン分泌を増加させることを示す。ＣＤ８$^{+}$又はＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞における所与のＯＲＦによって有意に（Ｐ＜０．０５）改善される異なるＴ細胞活性化表現型間の交差。
【図３Ａ】単一細胞のＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑが、Ｔ細胞における遺伝子過剰発現によ

って誘導される、共有された異なる転写プログラムを識別することを示す。ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑは、単一細胞における過剰発現（ＯＲＦ）構築物、トランスクリプトーム、ＴＣＲクロノタイプ、細胞表面タンパク質、及び治療ハッシュタグを捕捉する。
【図３Ｂ】単一細胞のＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑが、Ｔ細胞における遺伝子過剰発現によって誘導される、共有された異なる転写プログラムを識別することを示す。休止及びＣＤ３／ＣＤ２８刺激したＴ細胞におけるＯＲＦ割り当て率。
【図３Ｃ】単一細胞のＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑが、Ｔ細胞における遺伝子過剰発現によって誘導される、共有された異なる転写プログラムを識別することを示す。抗体由来タグ配列決定（ＡＤＴ、右）は、ｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞を用いたフローサイトメトリー（左）と同様のｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞におけるＮＧＦＲ発現を生じる。非形質導入細胞（左）又は非ｔＮＧＦＲ　ＯＲＦを割り当てられた細胞（右）が、灰色で示される。
【図３Ｄ】単一細胞のＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑが、Ｔ細胞における遺伝子過剰発現によって誘導される、共有された異なる転写プログラムを識別することを示す。ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑ捕捉したＯＲＦシングレットの非監視クラスタリング後の単一細胞トランスクリプトームの均一多様体近似及び投影（ＵＭＡＰ）表示。左上の挿入は、処理ハッシュタグによって与えられる刺激Ｔ細胞及び休止Ｔ細胞を識別する。各クラスターについて、上位２０の差次的に発現された遺伝子のサブセットが示される。ＨＩＳＴ１Ｈ１Ｂは、Ｈ１－５としても知られており、ＨＩＳＴ１Ｈ３Ｃは、Ｈ３Ｃ３としても知られている。
【図３Ｅ】単一細胞のＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑが、Ｔ細胞における遺伝子過剰発現によって誘導される、共有された異なる転写プログラムを識別することを示す。２つの代表的なクラスターにおけるＯＲＦ出現率。標準化した残存値は、カイ二乗検定からである。目的のＯＲＦが示される。
【図４Ａ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。休止ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ（陰性対照）Ｔ細胞における遺伝子の差次的発現。赤色で強調表示された遺伝子は、発現に２倍以上の変化、及び調整されたＰ＜０．０５を有する遺伝子である。
【図４Ｂ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。ＬＴＢＲ過剰発現性Ｔ細胞における有意に濃縮されたＧＯ生物学的プロセス（ｐ＜０．０５）。
【図４Ｃ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。ＣＤ３／ＣＤ２８で４日間再刺激したか、又は非刺激のままにしたかのいずれかである、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲレンチウイルスで形質導入したＣＤ８＋Ｔ細胞の細胞生存率（各々３回の生物学的反復を有するｎ＝２のドナー）。
【図４Ｄ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。最大３ラウンドの連続した刺激のために、３日毎に３：１の過剰のＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで刺激した休止ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲＴ細胞でのＰＤ－１発現。
【図４Ｅ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。野生型ＬＴＢＲに対して正規化した、Ｆｌａｇタグ付きＬＴＢＲ変異体で形質導入したＴ細胞によるＩＣＡＭ－１発現（休止）及びＩＬ－２の分泌（活性化）（２つの実験にわたってｎ＝６の反復）。
【図４Ｆ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。差次的にアクセス可能なクロマチンにおける転写因子モチーフの濃縮（各比較からの上位１０のモチーフ）。
【図４Ｇ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。示される期間でＣＤ３／ＣＤ２８抗体によって刺激されたＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞におけるリン酸化ＲＥＬＡ（ホスホ－ＲＥＬＡ）の定量化。
【図４Ｈ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。休止時又はＣＤ３／ＣＤ２８刺激（１５分）したＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ細胞におけるリン酸化ＩκＢαの定量化。
【図４Ｉ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改

善することを示す。休止時又はＣＤ３／ＣＤ２８刺激（１５分）したＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ細胞における成熟ＮＦ－κＢ２の定量化。
【図４Ｊ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。示される遺伝子のＣＲＩＳＰＲノックアウト後に刺激したＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ細胞によるＩＦＮγ分泌（ｎ＝１８、３回の生物学的反復における２名のドナーでの３つのｓｇＲＮＡ）。ＩＦＮγ量を対応する非標的化（ＮＴ）対照（ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲのいずれか）に対して正規化して、Ｔ細胞活性化での遺伝子ノックアウトの相対的効果の比較を可能にする。
【図４Ｋ】ＬＴＢＲ過剰発現が、標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化を通じてＴ細胞機能を改善することを示す。ＲＥＬＡ又はＲＥＬＢのＣＲＩＳＰＲノックアウト後のＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞におけるコアＬＴＢＲ遺伝子（ｎ＝２７４遺伝子）の発現レベル（ＬＴＢＲ細胞における非標的化対照に対して正規化した）。箱は、中央値のラインとともに２５～７５パーセンタイルを示し、ひげは四分位間の１．５倍伸長する。独立した両側ｔ検定Ｐ値（図４Ｃ、図４Ｇ～図４Ｋ）：有意でない（ＮＳ）Ｐ＞０．０５、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．０００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。他に明記されていない限り、エラーバー、ｓ．ｅ．ｍ．、ｎ＝３の生物学的反復。
【図５Ａ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。トリシストロニックベクター及びＣＡＲ　Ｔ細胞実験の概略図。
【図５Ｂ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞と１：１の比で一晩共インキュベートした後のＩＦＮγの分泌（ｎ＝３の生物学的反復、２名のドナーを表す）。
【図５Ｃ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞と１：１の比で一晩共インキュベートした後のＩＬ－２の分泌（ｎ＝３の生物学的反復、２名のドナーを表す）。
【図５Ｄ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。示されるエフェクター対標的比で、１９－２８ｚ　ＣＡＲ及びＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ（陰性対照）を共発現するＴ細胞との共インキュベーション後のＮａｌｍ６　ＧＦＰ$^{+}$細胞増殖（ウェル当たりの正規化した総ＧＦＰ）。
【図５Ｅ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。０．２５のエフェクター対標的比、及び４８時間の共インキュベーション後にｔＮＧＦＲに対して正規化した、１９－２８ｚ又は１８－ＢＢｚ　ＣＡＲ及びトップランクの遺伝子（ｎ＝３の生物学的反復、２名のドナーを表す）を共発現するＴ細胞についてのＮａｌｍ６　ＧＦＰ$^{+}$クリアランスの定量化。
【図５Ｆ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲを共発現する１９－ＢＢｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞を、最大３ラウンドの刺激のために、３日毎にＮａｌｍ６細胞と１：１の比で共インキュベートした（ｎ＝３の生物学的反復）。繰り返した抗原刺激の７日後、ＣＡＲ　Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞に再曝露した。ＩＦＮγ分泌を一晩インキュベーション後に測定した。
【図５Ｇ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫を有する患者からの全ＰＢＭＣへの抗ＣＤ１９ＣＡＲ及びＯＲＦの同時送達。形質導入Ｔ細胞を単独でインキュベートするか、又はＣＤ１９$^{+}$Ｎａｌｍ６若しくはＣＤ１９$^{-}$ジャーカット細胞株と１：１の比で共インキュベートした（ｎ＝３の生物学的反復、２名の患者を表す）。ＩＦＮγ及びＩＬ２の分泌は、一晩インキュベーション後に測定した。Ｎａｌｍ６条件について、示されたカラム対の上の

数は、ｔＮＧＦＲ（陰性対照）細胞に対するＬＴＢＲ細胞によるサイトカイン分泌の増加倍率である。
【図５Ｈ】トップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答及び腫瘍殺滅を改善することを示す。Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞へのＯＲＦの送達。リン酸化抗原蓄積を促進するためにゾレドロネートで前処理した、膵管腺がん（ＰＤＡＣ）株Ｃａｐａｎ－２との一晩共インキュベーション後のＩＦＮγ及びＩＬ－２の分泌（ｎ＝３の生物学的反復）。データは、該当する場合、平均±ｓ．ｅ．ｍ．である。
【図６Ａ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ＯＲＦ過剰発現のためのバーコード化ベクター設計。
【図６Ｂ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ライブラリにおけるＯＲＦ当たりのバーコード数の分布。
【図６Ｃ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。レンチウイルス形質導入効率に対する異なるプロモーター及びＯＲＦ挿入サイズの影響を定量化するためのベクター設計。ＥＦＳ－伸長因子－１αショートプロモーター、ＣＭＶ－サイトメガロウイルスプロモーター、ＰＧＫ－ホスホグリセレートキナーゼ－１プロモーター。形質導入した初代ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のピューロマイシン選択後、ＥＦＳ及びＣＭＶプロモーターから発現されたラットＣＤ２（ｒＣＤ２）の（図６Ｄ）陽性細胞のパーセンテージ及び（図６Ｅ）平均蛍光強度（ＭＦＩ）。各データポイントは、個々の形質導入（ｎ＝３の生物学的反復）を示す。エラーバーはＳＥＭである。
【図６Ｄ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。レンチウイルス形質導入効率に対する異なるプロモーター及びＯＲＦ挿入サイズの影響を定量化するためのベクター設計。ＥＦＳ－伸長因子－１αショートプロモーター、ＣＭＶ－サイトメガロウイルスプロモーター、ＰＧＫ－ホスホグリセレートキナーゼ－１プロモーター。形質導入した初代ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のピューロマイシン選択後、ＥＦＳ及びＣＭＶプロモーターから発現されたラットＣＤ２（ｒＣＤ２）の陽性細胞のパーセンテージ）。各データポイントは、個々の形質導入（ｎ＝３の生物学的反復）を示す。エラーバーはＳＥＭである。
【図６Ｅ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。レンチウイルス形質導入効率に対する異なるプロモーター及びＯＲＦ挿入サイズの影響を定量化するためのベクター設計。ＥＦＳ－伸長因子－１αショートプロモーター、ＣＭＶ－サイトメガロウイルスプロモーター、ＰＧＫ－ホスホグリセレートキナーゼ－１プロモーター。形質導入した初代ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のピューロマイシン選択後、ＥＦＳ及びＣＭＶプロモーターから発現されたラットＣＤ２（ｒＣＤ２）の平均蛍光強度（ＭＦＩ）。各データポイントは、個々の形質導入（ｎ＝３の生物学的反復）を示す。エラーバーはＳＥＭである。
【図６Ｆ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ゲノムスケールライブラリにおけるＯＲＦサイズの分布。パネル図６Ｄ及び図６Ｅで試験したＴＣＲ－ｒＣＤ２構築物のサイズが示されている。
【図６Ｇ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８抗体の力価測定。Ｔ細胞をＣＦＳＥで標識し、刺激して４日間インキュベートした。増殖性Ｔ細胞のゲートを、増殖した細胞を含むように少なくとも２回設定した（第３のＣＦＳＥピーク）。
【図６Ｈ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ＯＲＦライブラリで形質導入した３名の健常なドナーからのＴ細胞の拡張。
【図６Ｉ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。選別前の再刺激したＣＤ８$^{+}$及びＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の代表的なＣＦＳＥプロファイル。ＣＦＳＥ^{低}選別ゲートが記されている。
【図６Ｊ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。レンチウイルス産生に使用される形質導入Ｔ細胞及びプラスミドにおける個々のバーコード又は対応するＯＲＦの回収。３名のドナーからのそれぞれの試料を、等しい数のリードで一

緒にコンピューターでプールしてから、バーコード又はＯＲＦがどれだけ存在したか最小１リードで計数した。
【図６Ｋ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。個々のバーコードを対応する遺伝子に崩壊させることによって計算された、ＣＦＳＥ^{低}ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方における遺伝子の濃縮。有意に濃縮された遺伝子（０．５を超える$\log_2$倍変化、及び０．０５未満の調整ｐ値）が、赤色で示されている。目的の免疫応答遺伝子が示されている。
【図６Ｌ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。図６Ｋにおける有意に濃縮された遺伝子に対するＧＯ生物学的プロセス。
【図６Ｍ】初代Ｔ細胞におけるヒトＯＲＦライブラリスクリーニングの設計を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激したＴ細胞とナイーブＴ細胞との間で差次的に発現された遺伝子と有意に濃縮された遺伝子とのオーバーラップ[41]。
【図７Ａ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ピューロマイシン選択後のＴ細胞における選択したＯＲＦ発現のヒストグラム。
【図７Ｂ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。形質導入したＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるｔＮＧＦＲ発現の定量化。ピューロマイシンの選択は、形質導入の７日後に完了した。培養中にＴ細胞を維持するために、２１及び４２日目にＣＤ３／ＣＤ２８で再刺激した。
【図７Ｃ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＯＲＦサイズと、ｔＮＧＦＲと比較した増殖における変化との間の相関関係。平均$\log_2$倍率変化が示される。
【図７Ｄ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。個々のドナーにおけるｔＮＧＦＲと比較した、再刺激したＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖（ｎ＝３の生物学的反復）。平均及びＳＥＭが示される。
【図７Ｅ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。個々のドナーにおけるｔＮＧＦＲと比較した、再刺激したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の増殖（ｎ＝３の生物学的反復）。平均及びＳＥＭが示される。
【図７Ｆ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｙｅｌｌｏｗの希釈によって測定された、Ｔ細胞増殖を有意に改善したＯＲＦ（図２Ｃを参照）で形質導入したＴ細胞の増殖。代表的なＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｙｅｌｌｏｗヒストグラム及びフィッティングした分布が示される（ｎ＝３の生物学的反復）。Ｐ値：＜０．０００１、０．０００８、＜０．０００１、０．０１１、０．００３１、０．０００７、＜０．０００１、０．２８、０．００４、＜０．０００１、０．５８、０．０１、０．０００３、＜０．０００１、０．０３６、０．００４９（左から右へ）。
【図７Ｇ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　Ｙｅｌｌｏｗの希釈によって測定された、Ｔ細胞増殖を有意に改善したＯＲＦ（図２Ｃを参照）で形質導入したＴ細胞の増殖。増殖指数の定量化が示される（ｎ＝３の生物学的反復）。Ｐ値：＜０．０００１、０．０００８、＜０．０００１、０．０１１、０．００３１、０．０００７、＜０．０００１、０．２８、０．００４、＜０．０００１、０．５８、０．０１、０．０００３、＜０．０００１、０．０３６、０．００４９（左から右へ）。
【図７Ｈ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８再刺激の４日後のＯＲＦ形質導入Ｔ細胞の生存率。１名のドナー（試験した４名のドナーから）からの代表的なデータが示される（ｎ＝３の生物学的反復、ＣＤ８左バー、ＣＤ４右バー）。
【図７Ｉ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８で２４時間刺激したＴ細胞の細胞周期分析。ゲーティングは、アイソタイプ及び蛍光マイナス１対照に基づいて行った。代表的なゲーティングの定量化を示す（２名のドナーからのｎ＝６の生物学的反復）。Ｐ値：１、０．２９、０．００６５、０

．１７、０．００５１、１、０．１３、０．５５、０．０００４、０．９８、０．００８８、０．６８、０．９１、０．７、１（左から右）。パネル図７Ｇ及び図７Ｉにおける統計的有意性：ダネットの多重比較検定を用いた一元配置ＡＮＯＶＡ　＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。エラーバーは、ＳＥＭを示す。

【図７Ｊ】スクリーニングに無関係なドナーにおける選択されたＯＲＦの過剰発現を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８で２４時間刺激したＴ細胞の細胞周期分析。ゲーティングは、アイソタイプ及び蛍光マイナス１対照に基づいて行った。Ｓ－Ｇ２－Ｍ期における細胞（刺激したＴ細胞について）の定量化を示す（２名のドナーからのｎ＝６の生物学的反復）。Ｐ値：１、０．２９、０．００６５、０．１７、０．００５１、１、０．１３、０．５５、０．０００４、０．９８、０．００８８、０．６８、０．９１、０．７、１（左から右）。パネル図７Ｇ及び図７Ｉにおける統計的有意性：ダネットの多重比較検定を用いた一元配置ＡＮＯＶＡ　＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。エラーバーは、ＳＥＭを示す。

【図８Ａ】ＯＲＦ過剰発現性Ｔ細胞の機能的応答を示す。再刺激後のＣＤ２５又はＣＤ１５４の定量的発現。最小２名のドナーを、遺伝子当たり三重で試験した。$CD4^+$、$CD8^+$、又は両方のＴ細胞サブセットにおけるＴ細胞増殖を有意に増加させる遺伝子のみが示される。平均及びＳＥＭが示される。ＣＤ４＋は上部バーに示され、ＣＤ８＋細胞は下部バーに示される。

【図８Ｂ】ＯＲＦ過剰発現性Ｔ細胞の機能的応答を示す。抗原用量に対する感受性。Ｔ細胞を、示された抗ＣＤ３抗体濃度で２４時間インキュベートし、分泌されたＩＦＮγの量を定量した。代表的な用量応答曲線フィッティングが示される（ｎ＝２の生物学的反復）。

【図８Ｃ】ＯＲＦ過剰発現性Ｔ細胞の機能的応答を示す。抗原用量に対する感受性。Ｔ細胞を、示された抗ＣＤ３抗体濃度で２４時間インキュベートし、分泌されたＩＦＮγの量を定量した。IC_{50}定量が示される（ｎ＝２の生物学的反復）。

【図８Ｄ】ＯＲＦ過剰発現性Ｔ細胞の機能的応答を示す。単独で、又はＣＤ３／ＣＤ２８抗体とともに２４時間インキュベートしたＴ細胞における分泌型ＩＬ－２及びＩＦＮγの定量化。４名のドナーのうちの１名からの代表的なデータ（ｎ＝３の生物学的反復）を示す。休止細胞を左側のバーで示し、＋ＣＤ３／ＣＤ２８を右側に示す。

【図８Ｅ】ＯＲＦ過剰発現性Ｔ細胞の機能的応答を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激の２４時間後のＯＲＦ形質導入Ｔ細胞による、選択した分泌サイトカイン及びケモカインの多重定量化。ｔＮＧＦＲに対して正規化した二重測定の平均（独立した試料から）ｚスコアが示される。

【図９Ａ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。ゲルビーズバーコードによって特定される細胞の品質パラメータ。陰性、シングレット、及びダブレットは、細胞ハッシングに基づいて割り当てられる。

【図９Ｂ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。各ＯＲＦに割り当てられた細胞中の刺激したＴ細胞及び休止Ｔ細胞の割合。刺激した細胞及び休止細胞の有意にシフトした（不均一な）分布を有するＯＲＦについて、カイ二乗検定ｐ値が示される。

【図９Ｃ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。それぞれのＯＲＦ及び陰性対照（ｔＮＧＦＲ）で形質導入された細胞における過剰発現遺伝子の細胞周期を補正してスケーリングした発現。バイオリンプロットの上に示された両側ウィルコクソンテストｐ値は、特異的ＯＲＦ形質導入Ｔ細胞とｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞との間の遺伝子発現レベルの統計的有意性を示す。箱は、２５～７５パーセンタイルを中央値のラインとともに示し、ひげは、最大値及び最小値まで伸びている。Ｎ＝７１（ＡＤＡ）、１４７（ＡＨＣＹ）、１９０（ＡＨＮＡＫ）、１１９（ＡＫＲ１Ｃ４）、１２４（ＡＴＦ６Ｂ）、１７９（ＢＡＴＦ）、１３７（ＣＡＬＭＬ３）、１８９（ＣＤＫ１）、１２９（ＣＤＫ２）、２３６（ＣＬＩＣ１）、８４（ＣＲＬＦ２）、９１（ＣＸＣＬ１２）

、８８（ＣＹＰ２７Ａ１）、１２９（ＤＢＩ）、２６（ＤＣＬＲＥ１Ｂ）、２６１（ＤＵＰＤ１）、２５（ＦＯＳＢ）、１１９（ＧＰＤ１）、１２４（ＧＰＮ３）、１９９（ＩＦＮＬ２）、６０（ＩＬ１２Ｂ）、７０（ＩＬ１ＲＮ）、１５６（ＩＴＭ２Ａ）、７４（ＬＴＢＲ）、８８（ＭＲＰＬ１８）、１６７（ＭＲＰＬ５１）、１０７（ＭＳ４Ａ３）、６９（ＮＦＹＢ）、３５５（ＮＧＦＲ）、２６１（ＲＡＮ）、１８２（ＳＬＣ１０Ａ７）、及び５６（ＺＮＦ８３０）の単一細胞。

【図９Ｄ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。各ＯＲＦを割り当てた細胞による、全てのＯＲＦ遺伝子の発現。各行は、ｚスコア正規化されている。

【図９Ｅ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。クラスター内の個々のＯＲＦ頻度の分布。ＯＲＦ細胞の数及びカイ二乗検定の残差が表示される。各クラスターにおけるＯＲＦ分布が全体のＯＲＦ分布と有意に異なるかを示すカイ二乗検定ｐ値が、プロットの上に示される。各クラスターにおける刺激したＴ細胞及び休止Ｔ細胞の割合は、クラスター表示の下に示される。

【図９Ｆ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。休止した集団における選択したＯＲＦ細胞の転写プロファイル間のスピアマン相関。

【図９Ｇ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。刺激した集団における選択したＯＲＦ細胞の転写プロファイル間のスピアマン相関。

【図９Ｈ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。休止Ｔ細胞及び刺激Ｔ細胞において示されるＯＲＦを有する細胞間の最上位の差次的発現遺伝子の倍率変化。各条件について、（ｔＮＧＦＲ細胞と比較して）最も強い転写変化を有するＯＲＦが示される。

【図９Ｉ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。休止Ｔ細胞と比較した、刺激したＯＲＦ　Ｔ細胞における差次的遺伝子発現。少なくとも１つのＯＲＦにおいて有意な発現変化を有する遺伝子が示される（ＤＥＳｅｑ２調整ｐ＜０．０５）。全ての遺伝子について、ｔＮＧＦＲ（休止）に対するｔＮＧＦＲ（刺激した）の$\log_2$倍率変化に対して正規化された、ｔＮＧＦＲ（休止）に対する各ＯＲＦ（刺激した）の$\log_2$倍率変化を示す。各クラスター中の目的の遺伝子が標識されている。

【図９Ｊ】ＯＲＦ及びそれらの転写効果を特定するＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを示す。ＯＲＦ細胞における平均ＴＣＲクローンタイプ多様性。

【図１０Ａ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。遺伝子型－組織発現（ＧＴＥｘ）プロジェクトｖ８[75]（ｎ＝９４８ドナー）からの示されたヒト初代組織におけるＬＴＢＲ発現。箱は２５～７５パーセンタイルを中央値のラインとともに示す。

【図１０Ｂ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。２名のドナーからの細胞３１，０２１個からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）におけるＬＴＢＲ発現[76]。示される細胞型は、単一細胞トランスクリプトームのハーモニーｔＳＮＥクラスタリングに由来する。

【図１０Ｃ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。単一細胞又はバルクＲＮＡ－ｓｅｑで特定されたｔＮＧＦＲ細胞と比較した、ＬＴＢＲ細胞における有意に上方調節された遺伝子間のオーバーラップ。

【図１０Ｄ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞におけるＴＣＦ１発現。ＴＣＦ１発現の代表的なヒストグラム及びＴＣＦ１＋細胞のためのゲート（破線）が示される（ｎ＝３の生物学的反復）。

【図１０Ｅ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞におけるＴＣＦ１発現。ＴＣＦ１$^+$細胞の定量化が示される（ｎ＝３の生物学的反復）。

【図１０Ｆ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞におけるＩＣＡＭ－１、ＣＤ７０、ＣＤ７４、及びＭＨＣ－ＩＩ発現。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激後のＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞における発現の、ｎ＝３ドナー（ＣＤ８$^+$）又はｎ＝４ドナー（ＣＤ４$^+$）における代表的なヒストグラム。

【図１０Ｇ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞におけるＩＣＡＭ－１、ＣＤ７０、ＣＤ７４、及びＭＨＣ－ＩＩ発現。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激後のＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞における発現の、ｎ＝３ドナー（ＣＤ８$^+$）又はｎ＝４ドナー（ＣＤ４$^+$）における定量化（ｎ＝３の生物学的反復）。

【図１０Ｈ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞におけるＩＣＡＭ－１、ＣＤ７０、ＣＤ７４、及びＭＨＣ－ＩＩ発現。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激後のＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞における発現の時間経過（ｎ＝３の生物学的反復）。

【図１０Ｉ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＮＧＦＲ及びＬＴＢＲ形質導入Ｔ細胞の分化表現型（ｎ＝４ドナー、別々にＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$）。ＣＭ：セントラルメモリー。ＥＭ：エフェクターメモリー。分化は、ＣＤ４５ＲＯ及びＣＣＲ７発現に基づいて定義された（ナイーブ：ＣＤ４５ＲＯ^{neg}ＣＣＲ７$^+$、ＣＭ：ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７$^+$、ＥＭ：ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７^{neg}、エフェクターＣＤ４５ＲＯ^{neg}ＣＣＲ７^{neg}）。

【図１０Ｊ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８刺激後のＴ細胞生存率の代表的なドットプロット。生存細胞は、左下象限にある。

【図１０Ｋ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８で４日間再刺激したか、又は非刺激のままにしたかのいずれかである、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲレンチウイルスで形質導入したＣＤ４$^+$Ｔ細胞の細胞生存率（各々３回の生物学的反復を有するｎ＝２のドナー）。

【図１０Ｌ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞を、最大３ラウンドの刺激のために、３日毎に３：１の過剰ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで刺激した。繰り返した刺激後、ＴＩＭ－３及びＬＡＧ－３の発現を休止細胞で測定した（ｎ＝３の生物学的反復）。パネル図１０Ｅ、図１０Ｉ、及び図１０Ｋにおける統計的有意性：両側独立ｔ検定、パネル図１０Ｇ：両側対応ｔ検定。エラーバーは、ＳＥＭを示す。

【図１０Ｍ】Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現の機能分析を示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞を、最大３ラウンドの刺激のために、３日毎に３：１の過剰ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズで刺激した。繰り返した刺激後、ＩＦＮγ及びＩＬ２の分泌を再刺激した細胞で測定した（ｎ＝３の生物学的反復）。パネル図１０Ｅ、図１０Ｉ、及び図１０Ｋにおける統計的有意性：両側独立ｔ検定、パネル図１０Ｇ：両側対応ｔ検定。エラーバーは、ＳＥＭを示す。

【図１１Ａ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。ＣＤ３／ＣＤ２８抗体を用いた２４時間刺激後のＩＬ２分泌。示される場合、組換え可溶性ＬＴＡ（１ｎｇ／ｍＬ）又はＬＩＧＨＴ（１０ｎｇ／ｍＬ）を、ＣＤ３／ＣＤ２８抗体と一緒に添加した。１名のドナーからのＣＤ４$^+$Ｔ細胞を三重で試験した。

【図１１Ｂ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。２名のドナーからのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８抗体又は組換え可溶性ＬＴＡ又はＬＩＧＨＴとともに２４時間共インキュベートし、次いでＩＬ２を測定した。（ｎ＝３の生物学的反復）。左から右へ、刺激なし、＋ＣＤ３／ＣＤ２８、＋ＬＴＡ、及び＋ＬＩＧＨＴが示される。

【図１１Ｃ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。２名のドナーからのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８抗体又は組換え可溶性ＬＴＡ又はＬＩＧＨＴとともに２４時間共インキュベートし、次いでＩＦＮγを測定した。（ｎ＝３の生物学的反復）。左から右へ、刺激なし、＋ＣＤ３／ＣＤ２８、＋ＬＴＡ、及び＋ＬＩＧＨＴが示される。

【図１１Ｄ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。培養期間中、ＩＬ２単独又はＬＴＡ（１ｎｇ／ｍＬ）若しくはＬＩＧＨＴ（１０ｎｇ／ｍＬ）のいずれかとともにインキュベートしたｔＮＧＦＲ及びＬＴ

ＢＲ形質導入Ｔ細胞の再刺激後の分化表現型（ｎ＝３の生物学的反復）。ＣＭ：セントラルメモリー。ＥＭ：エフェクターメモリー。独立した両側ｔ検定ｐ値が示される。
【図１１Ｅ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。培養期間中、ＩＬ２単独又はＬＴＡ（１ｎｇ／ｍＬ）若しくはＬＩＧＨＴ（１０ｎｇ／ｍＬ）のいずれかとともにインキュベートしたｔＮＧＦＲ及びＬＴＢＲ形質導入Ｔ細胞の再刺激後の増殖（ｎ＝３の生物学的反復）。ＣＭ：セントラルメモリー。ＥＭ：エフェクターメモリー。独立した両側ｔ検定ｐ値が示される。
【図１１Ｆ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。ｍＲＮＡヌクレオフェクションを介した一過性ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ発現。Ｔ細胞を、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　ｍＲＮＡでヌクレオフェクションし（ｎ＝３の生物学的反復）、ＬＴＢＲ（図１１Ｇ）、ｔＮＧＦＲ（図１１Ｈ）、又はＬＴＢＲ細胞内で上方調節された４つの遺伝子（図１１Ｉ）の表面発現を２１日間にわたってモニタリングした。各時点で、標的遺伝子の発現を、該当したｔＮＧＦＲ対照に対して正規化した。
【図１１Ｇ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。Ｔ細胞を、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　ｍＲＮＡでヌクレオフェクションし（ｎ＝３の生物学的反復）、ＬＴＢＲの表面発現を２１日間にわたってモニタリングした。各時点で、標的遺伝子の発現を、該当したｔＮＧＦＲ対照に対して正規化した。
【図１１Ｈ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。Ｔ細胞を、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　ｍＲＮＡでヌクレオフェクションし（ｎ＝３の生物学的反復）、ｔＮＧＦＲ（の表面発現を２１日間にわたってモニタリングした。各時点で、標的遺伝子の発現を、該当したｔＮＧＦＲ対照に対して正規化した。
【図１１Ｉ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。Ｔ細胞を、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　ｍＲＮＡでヌクレオフェクションし（ｎ＝３の生物学的反復）、ＬＴＢＲ細胞内で上方調節された４つの遺伝子の表面発現を２１日間にわたってモニタリングした。各時点で、標的遺伝子の発現を、該当したｔＮＧＦＲ対照に対して正規化した。
【図１１Ｊ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。ＦＬＡＧタグ付きＬＴＢＲ変異体の概略図。
【図１１Ｋ】ｍＲＮＡを介した、又は欠失及び点変異体を有する、ＬＴＢＲリガンド及びＬＴＢＲの発現を示す。ＬＴＢＲ変異体で形質導入したＴ細胞におけるＬＴＢＲ及びＦＬＡＧ発現。エラーバーは、ＳＥＭを示す。
【図１２Ａ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。休止しているか、又はＣＤ３／ＣＤ２８で２４時間刺激したかのいずれかの、ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞の全体的にアクセス可能なクロマチン領域の主成分（ＰＣ）分析。
【図１２Ｂ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。刺激したｔＮＧＦＲと休止ｔＮＧＦＲとの間、刺激したＬＴＢＲと休止ＬＴＢＲとの間、休止ＬＴＢＲと休止ｔＮＧＦＲとの間、及び刺激したＬＴＢＲと刺激したｔＮＧＦＲとの間の差次的にアクセス可能なクロマチン領域。得られた／失われたピークの数が示される（カットオフとして、１の絶対$\log_2$倍率変化及び調整されたｐ値＜０．１を使用する）。
【図１２Ｃ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。差次的に発現した（調節されたｐ＜０．０５）遺伝子についてのクロマチンアクセシビリティにおける変化。両側ｔ検定ｐ値が示される。箱は、２５～７５パーセンタイルを中央値のラインとともに示し、ひげは１．５×四分位範囲まで伸びている。Ｎ＝６１４の遺伝子。
【図１２Ｄ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。差次的にアクセス可能な（調節されたｐ＜０．０５）領域についての遺伝子発現における変化。両側ｔ検定ｐ値が示される。箱は、２５～７５パーセンタイルを中央値のラインとともに示し、ひげは１．５×四分位範囲まで伸びている。Ｎ＝６１４のゲノム領域。

【図１２Ｅ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。休止又は２４時間刺激した、ｔＮＧＦＲ細胞と比較したＬＴＢＲにおいて、より多い遺伝子座でのクロマチンアクセシビリティプロファイル。ｙ軸は、正規化したリードを表す（スケール：ＢＡＴＦ３では０～８６０、ＩＬ１３では０～１９５０、ＴＲＡＦ１では０～１２３０、ＴＮＦＳＦ４では０～１０００、ＰＤＣＤ１では０～３００、ＬＡＧ３では０～２３５０）。

【図１２Ｆ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。休止又は２４時間刺激した、ｔＮＧＦＲ細胞と比較したＬＴＢＲにおいて、より少ない開放性の遺伝子座でのクロマチンアクセシビリティプロファイル。ｙ軸は、正規化したリードを表す（スケール：ＢＡＴＦ３では０～８６０、ＩＬ１３では０～１９５０、ＴＲＡＦ１では０～１２３０、ＴＮＦＳＦ４では０～１０００、ＰＤＣＤ１では０～３００、ＬＡＧ３では０～２３５０）。

【図１２Ｇ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。休止又は刺激したＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞におけるクロマチンアクセシビリティ。各行は、該当したｔＮＧＦＲ対照よりも有意に濃縮したＬＴＢＲのピークを表す（$\log_2$倍率変化＞１、ＤＥＳｅｑ２調整されたｐ値＜０．０５）。ピークは、ｋ平均クラスタリングを使用してクラスター化され、各クラスターからのピーク又はピーク付近の選択された遺伝子が示される。

【図１２Ｈ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。バイアス補正した偏差に基づく、各ＡＴＡＣ試料（生物学的複製物）の相関。

【図１２Ｉ】ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるクロマチンのアクセシビリティを示す。休止ｔＮＧＦＲ細胞と比較した、休止ＬＴＢＲ細胞における差次的にアクセス可能なクロマチン領域で濃縮された最上位転写因子（ＴＦ）モチーフ。

【図１３Ａ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞における細胞内フローサイトメトリーによるホスホ－ＲＥＬＡ染色。ホスホ－ＲＥＬＡ＋細胞の特定のためのゲーティングが示される。

【図１３Ｂ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。休止又はＣＤ３／ＣＤ２８で１５分間刺激した、ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞でのＮＦ－κＢ経路における主要タンパク質のウェスタンブロット定量化。代表的なゲルを示す（ｎ＝３の生物学的反復）。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。

【図１３Ｃ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。休止又はＣＤ３／ＣＤ２８で１５分間刺激した、ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ細胞でのＮＦ－κＢ経路における主要タンパク質のウェスタンブロット定量化。ＧＡＰＨＤに対するバンド強度の定量化を示す（ｎ＝３の生物学的反復）。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。

【図１３Ｄ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＬＴＢＲシグナル伝達経路の表示。各遺伝子は、該当するｔＮＧＦＲ細胞（$CD4^+$及び$CD8^+$Ｔ細胞、休止又は２４時間刺激）に対するＬＴＢＲにおける差次的発現に基づいて着色されている。

【図１３Ｅ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。Ｔ細胞を、一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）及びＬＴＢＲ　ＯＲＦを共発現するレンチウイルスベクターで形質導入した。形質導入後、Ｃａｓ９タンパク質がヌクレオフェクションを介して送達された。

【図１３Ｆ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。Ｔ細胞を、一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）及びＬＴＢＲ　ＯＲＦを共発現するレンチウイルスベクターで形質導入した。ＭＨＣ－Ｉ複合体の必須成分であるＢ２Ｍ、又はαβＴＣＲの必須成分であるＴＲＢＣ１／２を標的とするｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲ細胞における標的遺伝子の代表的な発現。

【図１３Ｇ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。Ｔ細胞を、一本鎖ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）及びＬＴＢＲ　ＯＲＦを共発現するレンチウイルスベクターで形質導入した。再刺激後のＩＦＮγの定量化（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。
【図１３Ｈ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの代表的なヒストグラムが示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｉ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの相対発現レベルの定量化が示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｊ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの代表的なヒストグラムが示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｋ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの相対発現レベルの定量化が示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｌ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの代表的なヒストグラムが示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｍ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、及びＲＥＬＡの相対発現レベルの定量化が示される（ｎ＝３　ｓｇＲＮＡ）。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。
【図１３Ｎ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。代表的なゲルが示される（ｎ＝　３　ＲＥＬＢについてのｓｇＲＮＡ及びｎ＝２　非標的化対照ｓｇＲＮＡ）。
【図１３Ｏ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。ＣＲＩＳＰＲ及びＯＲＦ過剰発現を介した同時遺伝子ノックアウト。遺伝子ノックアウト効率の代表的なタンパク質レベルに基づく定量化。破線は、所与のタンパク質を発現する細胞を列挙するために使用されたゲートを表す。ＲＥＬＢ発現の定量化が示される（ｎ＝　３　ＲＥＬＢについてのｓｇＲＮＡ及びｎ＝２　非標的化対照ｓｇＲＮＡ）。
【図１３Ｐ】ＮＦ－κＢ活性化のプロテオミクス及び機能的ゲノムアッセイを示す。該当するｔＮＧＦＲ対照（「Ｃｏｒｅ　ＬＴＢＲ」遺伝子）に対して、ＬＴＢＲで形質導入されたＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方で濃縮されたとして特定された２７４個の遺伝子の特定。エラーバーは、ＳＥＭを示す。
【図１４Ａ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦレンチウイルスベクター又はＯＲＦ単独の形質導入効率（ｎ＝４　生物学的反復）。

【図１４Ｂ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。抗マウスＦａｂ　Ｆ（ａｂ’）$_2$で染色することによって決定されたＣＡＲ発現レベル。代表的なヒストグラムが、２名の健常なドナー及びびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）を有する２名の患者について示される。
【図１４Ｃ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。抗マウスＦａｂ　Ｆ（ａｂ’）$_2$で染色することによって決定されたＣＡＲ発現レベル。ｔＮＧＦＲに対するＣＡＲ発現の定量化が、２名の健常なドナー及びびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）を有する２名の患者について示される。
【図１４Ｄ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ形質導入Ｔ細胞（ｎ＝４　生物学的反復）の拡張曲線。
【図１４Ｅ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。自己ＣＤ１４$^+$単球及びＬＴＢＲ単独又はＣＡＲ＋ＬＴＢＲで形質導入したＴ細胞におけるＬＴＢＲ発現。
【図１４Ｆ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＬＴＢＲ　ＯＲＦのみ、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又はＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲで形質導入したＴ細胞による、ＩＣＡＭ－１の発現。全てのデータは、ｔＮＧＦＲのみ（ＣＡＲはない）に対して正規化されている。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。
【図１４Ｇ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＬＴＢＲ　ＯＲＦのみ、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又はＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲで形質導入したＴ細胞による、ＣＤ７０の発現。全てのデータは、ｔＮＧＦＲのみ（ＣＡＲはない）に対して正規化されている。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。
【図１４Ｈ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＬＴＢＲ　ＯＲＦのみ、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又はＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲで形質導入したＴ細胞による、ＣＤ７４の発現。全てのデータは、ｔＮＧＦＲのみ（ＣＡＲはない）に対して正規化されている。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。
【図１４Ｉ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＬＴＢＲ　ＯＲＦのみ、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又はＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲで形質導入したＴ細胞による、ＭＨＣ－ＩＩの発現。全てのデータは、ｔＮＧＦＲのみ（ＣＡＲはない）に対して正規化されている。独立した両側ｔ検定によるｐ値が示される。
【図１４Ｊ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における疲弊マーカーＰＤ－１の発現。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。
【図１４Ｋ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における疲弊マーカーＴＩＭ－３の発現。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。
【図１４Ｌ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における疲弊マーカーＬＡＧ－３の発現。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。
【図１４Ｍ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における疲弊マーカーＣＤ３９の発現。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。
【図１４Ｎ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。ＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞の分化表現型。ＣＭ：セントラルメモリー。ＥＭ：エフェクターメモリー。分化は、ＣＤ４５ＲＯ及びＣＣＲ７発現に基づいて定義された（ナイーブ：ＣＤ４５ＲＯ^{neg}ＣＣＲ７$^+$、ＣＭ：ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７$^+$、ＥＭ：ＣＤ４５ＲＯ$^+$ＣＣＲ７^{neg}、エフェクターＣＤ４５ＲＯ^{neg}ＣＣＲ７^{neg}）。
【図１４Ｏ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。単独で又はＮａｌｍ６細胞とともに２４時間インキュベートしたＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における活性化マーカーＣＤ２５の発現。エラーバーは、ＳＥＭを示す。他に示されない限り、Ｎ＝３　生物学的反復。
【図１４Ｐ】ＣＤ１９標的化ＣＡＲとのＯＲＦの共送達を示す。単独で又はＮａｌｍ６細胞とともに２４時間インキュベートしたＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞における活性化マーカーＣＤ６９の発現。エラーバーは、ＳＥＭを示す。他に示されない限り、Ｎ＝３　生物学的反復。
【図１５Ａ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応

答を促進することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞と１：１の比で一晩共インキュベートした後のＩＦＮγ分泌（ｎ＝３　生物学的反復、２名のドナーを表す）。
【図１５Ｂ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＣＤ１９　ＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞をＮａｌｍ６細胞と１：１の比で一晩共インキュベートした後のＩＬ２分泌（ｎ＝３　生物学的反復、２名のドナーを表す）。
【図１５Ｃ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。単独又はＮａｌｍ６細胞とともに２４時間共インキュベートした、ＣＡＲ＋ＯＲＦ又はＯＲＦのみのＴ細胞によるＩＦＮγ分泌。
【図１５Ｄ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。単独又はＮａｌｍ６細胞とともに２４時間共インキュベートした、ＣＡＲ＋ＯＲＦ又はＯＲＦのみのＴ細胞によるＩＬ－２分泌。
【図１５Ｅ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｎａｌｍ６　ＧＦＰ細胞との共インキュベーション後の、ｔＮＧＦＲ又はＬＴＢＲ　ＯＲＦを発現する１９－ＢＢｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性。
【図１５Ｆ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。異なるエフェクター：標的比でのＣＡＲ＋ＯＲＦ又はＯＲＦのみのＴ細胞におけるＮａｌｍ６クリアランスの定量化（非形質導入Ｔ細胞と共インキュベートしたＮａｌｍ６と比較）。独立した両側ｔ検定ｐ値：０．０１１、１．３×１０－４、０．０７２、０．０２、０．０２１、０．５２、０．０８７、１、０．５１（左から右へ）。
【図１５Ｇ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。１９－２８ｚ　ＣＡＲ及びＮＧＦＲ又はＬＴＢＲで形質導入し、ＣＤ１９$^{+}$Ｎａｌｍ６　ＧＦＰ細胞と１：１の比で４８時間共インキュベートしたＴ細胞の代表的な画像。スケールバー：２００μｍ。
【図１５Ｈ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｎａｌｍ６細胞によるＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞の反復した刺激。
【図１５Ｉ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｎａｌｍ６細胞によるＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞の反復した刺激。最大３ラウンドの刺激のために、３日毎にＮａｌｍ６細胞で繰り返した刺激後、Ｎａｌｍ６で再負荷した１９－ＢＢＺ　ＣＡＲ　ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞による、ＩＬ－２分泌。
【図１５Ｊ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｎａｌｍ６細胞によるＣＡＲ＋ＯＲＦ　Ｔ細胞の反復した刺激。最大３ラウンドの刺激のために、３日毎にＮａｌｍ６細胞で繰り返した刺激後、Ｎａｌｍ６で再負荷した１９－ＢＢＺ　ＣＡＲ　ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞による、Ｎａｌｍ６生存。
【図１５Ｋ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。ＤＬＢＣＬを有する２名の患者からのＣＡＲ／ＬＴＢＲ又はＣＡＲ／ｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞による、Ｎａｌｍ６標的細胞との一晩インキュベーション後のサイトカインＩＬ２及びＩＦＮγの分泌。両側対応ｔ検定ｐ値が示される。
【図１５Ｌ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｖγ９Ｖδ２　ＴＣＲを内因的に発現するＯＲＦ形質導入Ｔ細胞の代表的な染色。
【図１５Ｍ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。Ｖγ９Ｖδ２　ＴＣＲを発現するＯＲＦ形質導入Ｔ細胞の定量化。
【図１５Ｎ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。ＯＲＦ形質導入Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞と白血病細胞株との２４

時間の共インキュベーション後のＩＬ２分泌。
【図１５Ｏ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。ＯＲＦ形質導入Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞と白血病細胞株との２４時間の共インキュベーション後のＩＦＮγ分泌。
【図１５Ｐ】ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、抗原特異的Ｔ細胞応答を促進することを示す。ＯＲＦ形質導入Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞と、膵管腺がん細胞株であるＢｘＰＣ３との２４時間共インキュベーション後のＩＬ２又はＩＦＮγ分泌。パネル（図１５Ｎ～図１５Ｐ）における細胞株を、共インキュベーション前にゾレドロン酸で前処理した。エラーバーは、ＳＥＭを示す。別段の指示がない限り、Ｎ＝３　生物学的反復が示される。
【図１６Ａ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗メソテリンＣＡＲ及びＯＲＦの共送達。
【図１６Ｂ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。抗メソテリンＣＡＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞による、メソテリン－高細胞株Ｃａｐａｎ－２と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ２の分泌。特異的なサイトカイン分泌は、単独でインキュベートしたＴ細胞に観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベルを示した。
【図１６Ｃ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。抗メソテリンＣＡＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞による、メソテリン－高細胞株Ｃａｐａｎ－２と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ２の分泌。特異的なサイトカイン分泌は、単独でインキュベートしたＴ細胞に観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベル（を示した。
【図１６Ｄ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。抗メソテリンＣＡＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞による、メソテリン－低細胞株ＢｘＰＣ３と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ２の分泌。特異的なサイトカイン分泌は、単独でインキュベートしたＴ細胞に観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベルを示した。
【図１６Ｅ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。操作したＣＡＲ　Ｔ細胞とともに１：２のＴ細胞対がん細胞比で４８時間共インキュベーション後の、ＧＦＰ＋メソテリン－高Ｃａｐａｎ－２又はメソテリン－低ＢｘＰＣ３の殺滅。がん細胞殺滅は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）を含有するウェル中の組み込まれたＧＦＰシグナルを、特定の試料中の組み込まれたＧＦＰシグナルで除することによって正規化した。１を上回る比率は、該当するＣＡＲ対照（ＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲ）よりも、より高い殺滅、すなわち、特定の試料中のより低いＧＦＰシグナル（したがって、より少ない数のがん細胞）を示す。ＷＴ又はＣＡＲなし＝非形質導入Ｔ細胞。
【図１６Ｆ】固形腫瘍における抗原特異的ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善するトップランクの遺伝子を示す。操作したＣＡＲ　Ｔ細胞とともに１：２のＴ細胞対がん細胞比で４８時間共インキュベーション後の、ＧＦＰ＋メソテリン－高Ｃａｐａｎ－２又はメソテリン－低ＢｘＰＣ３の殺滅。がん細胞殺滅は、通常のＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）を含有するウェル中の組み込まれたＧＦＰシグナルを、特定の試料中の組み込まれたＧＦＰシグナルで除することによって正規化した。１を上回る比率は、該当するＣＡＲ対照（ＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲ）よりも、より高い殺滅、すなわち、特定の試料中のより低いＧＦＰシグナル（したがって、より少ない数のがん細胞）を示す。ＷＴ又はＣＡＲなし＝非形質導入Ｔ細胞。
【図１７Ａ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。健常なドナーからのＴ細胞への抗ＮＹ－ＥＳＯ－１　ＴＣＲ及び

ＯＲＦの共送達。
【図１７Ｂ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。抗ＮＹ－ＥＳＯ－１　ＴＣＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ８＋Ｔ細胞による、黒色腫細胞株Ａ３７５と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ－２の分泌。単独でインキュベートしたＴ細胞では、特異的なサイトカイン分泌は観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＴＣＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベルを示した。
【図１７Ｃ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。抗ＮＹ－ＥＳＯ－１　ＴＣＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ８＋Ｔ細胞による、黒色腫細胞株Ａ３７５と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ－２の分泌。単独でインキュベートしたＴ細胞では、特異的なサイトカイン分泌は観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＴＣＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベルを示した。
【図１７Ｄ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。抗ＮＹ－ＥＳＯ－１　ＴＣＲ及びＯＲＦで共形質導入したＣＤ８＋Ｔ細胞による、黒色腫細胞株Ａ３７５と一晩共インキュベートした後のサイトカインＩＦＮγ及びＩＬ－２の分泌。単独でインキュベートしたＴ細胞では、特異的なサイトカイン分泌は観察されなかった。Ｎ＝３　生物学的反復。破線は、通常のＴＣＲ　Ｔ細胞（すなわち、ｔＮＧＦＲを共発現する）におけるサイトカイン分泌のレベルを示した。
【図１７Ｅ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。１：１のＴ細胞対がん細胞の比で、操作したＴＣＲ　Ｔ細胞とともに４８時間共インキュベートしたＧＦＰ＋Ａ３７５細胞の殺滅。がん細胞殺滅は、特定の試料中の組み込まれたＧＦＰシグナルによって、Ａ３７５細胞のみを含有してＴ細胞を含有しないウェル中の組み込まれたＧＦＰシグナルを除することによって正規化した。ＴＣＲ＝非形質導入Ｔ細胞。
【図１７Ｆ】トップランクの遺伝子が、固形腫瘍における抗原特異的ＴＣＲ　Ｔ細胞応答を改善することを示す。１：１のＴ細胞対がん細胞の比で、操作したＴＣＲ　Ｔ細胞とともに４８時間共インキュベートしたＧＦＰ＋Ａ３７５細胞の殺滅。がん細胞殺滅は、特定の試料中の組み込まれたＧＦＰシグナルによって、Ａ３７５細胞のみを含有してＴ細胞を含有しないウェル中の組み込まれたＧＦＰシグナルを除することによって正規化した。ＴＣＲ＝非形質導入Ｔ細胞。
【図１８Ａ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｂ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｃ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｄ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｅ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｆ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１８Ｇ】ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑの概要を提供する。
【図１９】ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖで利用可能なキメラ抗原受容体に関する臨床試験のリスト化である。
【図２０】ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖで利用可能なＴ細胞受容体に関する臨床試験のリスト化である。
【図２１】キメラ抗原受容体の構築のための例示的な抗体配列を提供する。
【図２２Ａ】ＮＳＧマウスにおける播種性白血病モデルに対してＬＴＢＲを共発現する１９－ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビボ有効性を実証する。実験設計。雌ＮＳＧマウス（群当たりｎ＝４）に、５×１０^{5}個のＮａｌｍ６－ｌｕｃ細胞を尾静脈に接種した。４日後、生物発光（ＢＬＩ）測定を行ってマウスを病期分類して、各群が同じ中央値の腫瘍量を有することを確認した。翌日、非形質導入又はＣＡＲ形質導入Ｔ細胞（ＣＤ４：ＣＤ８、１：１）を尾静脈に注射した。
【図２２Ｂ】ＮＳＧマウスにおける播種性白血病モデルに対してＬＴＢＲを共発現する１

９－ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビボ有効性を実証する。試験期間内のマウスの生存率。ログランクＭａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ　ｐ値が示される。
【図２２Ｃ】ＮＳＧマウスにおける播種性白血病モデルに対してＬＴＢＲを共発現する１９－ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビボ有効性を実証する。背部及び腹部の全身ＢＬＩシグナル。全ての生存マウスについて個々の値が示される。ラインは各群の中央値を繋げている。ＬＴＢＲ群とｔＮＧＦＲ群との間の、事後シダックの多重比較検定ｐ値を伴う一元配置ＡＮＯＶＡを示す。＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。
【図２２Ｄ】ＮＳＧマウスにおける播種性白血病モデルに対してＬＴＢＲを共発現する１９－ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ　Ｔ細胞のインビボ有効性を実証する。各マウスについて開始体重（ｄ＝０）と比較した体重における変化。
【図２３】ＩＬ２の不存在下でのＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の生存率を実証する。形質導入して選択したＴ細胞を拡張させ、前述のようにＩＬ２の存在下で培養した。形質導入後１４日目に、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又はＣＡＲ＋ｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞を洗浄し、ＩＬ２添加及びＩＬ２無添加の２つの条件に分けた。次いで、細胞生存率を、トリパンブルー除外（２３日目まで）又は生存率色素を用いたフローサイトメトリー（２３日目以降）を使用して、直接的な細胞計数によって週３回評価した。各時点で、ＩＬ２なしの条件における生存細胞の数を、＋ＩＬ２条件における生存細胞の数と比較して、生存率を決定した。Ｎ＝３
【図２４Ａ】異なる培地におけるＬＴＢＲ表現型及び機能を実証する。健常なドナーからのＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を、活性化、レンチウイルス形質導入、選択、及び培養を含む、実験全体を通して所与の培地中で培養した。形質導入の１４日後、Ｔ細胞を、ＩＬ２無添加でそれぞれの培地に再懸濁させ、一晩刺激してサイトカイン分泌を誘導した。分泌したＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）の量を、ＥＬＩＳＡによって測定した。全ての該当条件における分泌サイトカインの平均量をｃ）に示す。
【図２４Ｂ】異なる培地におけるＬＴＢＲ表現型及び機能を実証する。健常なドナーからのＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を、活性化、レンチウイルス形質導入、選択、及び培養を含む、実験全体を通して所与の培地中で培養した。形質導入の１４日後、Ｔ細胞を、ＩＬ２無添加でそれぞれの培地に再懸濁させ、一晩刺激してサイトカイン分泌を誘導した。分泌したＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）の量を、ＥＬＩＳＡによって測定した。全ての該当条件における分泌サイトカインの平均量をｃ）に示す。
【図２４Ｃ】異なる培地におけるＬＴＢＲ表現型及び機能を実証する。健常なドナーからのＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞を、活性化、レンチウイルス形質導入、選択、及び培養を含む、実験全体を通して所与の培地中で培養した。形質導入の１４日後、Ｔ細胞を、ＩＬ２無添加でそれぞれの培地に再懸濁させ、一晩刺激してサイトカイン分泌を誘導した。分泌したＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）の量を、ＥＬＩＳＡによって測定した。全ての該当条件における分泌サイトカインの平均量をｃ）に示す。
【図２４Ｄ】異なる培地におけるＬＴＢＲ表現型及び機能を実証する。非形質導入対照に対して正規化された、ｔＮＧＦＲ又はＬＴＢＲで形質導入した、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞におけるＣＤ５４及びＣＤ７４の発現。
【図２４Ｅ】異なる培地におけるＬＴＢＲ表現型及び機能を実証する。ｔＮＧＦＲ又はＬＴＢＲで形質導入した、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞におけるエフェクターＴ細胞に対するセントラルメモリー（ＣＭ）の比。ＣＭ：ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＣＲ７＋、エフェクター：ＣＤ４５ＲＯ＋／－ＣＣＲ７－。図２４Ｆ）ｔＮＧＦＲ又はＬＴＢＲで形質導入した、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞におけるＰＤ１の発現。＊＊ｐ＜０．０１
【図２５Ａ】初代Ｔ細胞におけるＴＮＦＲＳＦメンバーの過剰発現を実証する。ＯＲＦ形質導入Ｔ細胞及び非形質導入Ｔ細胞における選択されたＴＮＦＲＳＦメンバーの表面発現。
【図２５Ｂ】初代Ｔ細胞におけるＴＮＦＲＳＦメンバーの過剰発現を実証する。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。ｔＮＧＦＲに対して正規化された、ＣＤ３／ＣＤ２８による刺激の４日後にＴＮＦＲＳＦメンバーで形質導入したＴ細胞の増殖。
【図２５Ｃ】初代Ｔ細胞におけるＴＮＦＲＳＦメンバーの過剰発現を実証する。ｔＮＧＦ

Ｒに対して正規化された、ＣＤ３／ＣＤ２８による２４時間刺激後にＴＮＦＲＳＦメンバーで形質導入したＴ細胞によるＩＦＮγ分泌。ＣＤ８　左バー、ＣＤ４　右バー。
【図２６Ａ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＣＤ３／ＣＤ２８で形質導入したＴ細胞の一晩刺激後のＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）分泌。分泌されたサイトカインの絶対量は、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｂ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＣＤ３／ＣＤ２８で形質導入したＴ細胞の一晩刺激後のＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）分泌。分泌されたサイトカインの絶対量は、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｃ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｄ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｅ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｆ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＬＴＢＲに対して正規化される。
【図２６Ｇ】ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現を実証する。ＬＴＢＲとの比較において、ＮＦκＢ経路の構成的に活性な正調節因子によって誘導される表現型のヒートマップの要約。ｔＮＧＦＲは、無関連の遺伝子として使用される。
【図２７Ａ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。左から右に、ＮＴ、ＴＮＦＡＰ３、及びＮＦＫＢＩＡ。ＣＤ３／ＣＤ２８で形質導入したＴ細胞の一晩刺激後のＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）分泌。分泌されたサイトカインの絶対量は、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｂ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。左から右に、ＮＴ、ＴＮＦＡＰ３、及びＮＦＫＢＩＡ。ＣＤ３／ＣＤ２８で形質導入したＴ細胞の一晩刺激後のＩＦＮγ（ａ）及びＩＬ２（ｂ）分泌。分泌されたサイトカインの絶対量は、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｃ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｄ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｅ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｆ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞において上方調節された代表的なマーカーの表面発現。発現レベルは、ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲに対して正規化される。各ドットは、個々のｓｇＲＮＡを表す。
【図２７Ｇ】ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトを実証する。ＮＴ　ｓｇＲＮＡを共発現するＬＴＢＲとの比較における、ＮＦκＢ経路の負の調節因子のノックアウトによって誘導された表現型のヒートマップ要約。
【図２８Ａ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。使用されるベクターの概略図。

【図２８Ｂ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞における、対応するＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子ベクターに対して正規化されたＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲの発現。
【図２８Ｃ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。ＣＤ１９＋標的細胞Ｎａｌｍ６とのＣＡＲ　Ｔ細胞の一晩共インキュベーションでのサイトカイン分泌。
【図２８Ｄ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。ＣＤ１９＋標的細胞Ｎａｌｍ６とのＣＡＲ　Ｔ細胞の一晩共インキュベーションでのサイトカイン分泌。
【図２８Ｅ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。ＣＤ１９＋標的細胞Ｎａｌｍ６とのＣＡＲ　Ｔ細胞の一晩共インキュベーションでのサイトカイン分泌。
【図２８Ｆ】ＬＴＢＲ及びＣＡＲの共発現のために位置決めしている導入遺伝子を実証する。ＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞における、対応するＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子ベクターに対して正規化された、標的細胞に応答したサイトカイン分泌。
【図２９Ａ】Ｔ細胞における誘導性導入遺伝子発現を実証する。ベクター設計。
【図２９Ｂ】Ｔ細胞における誘導性導入遺伝子発現を実証する。ａに示されるベクターで形質導入したＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ（ｂ）及びｔＮＧＦＲ（ｃ）の発現。Ｔ細胞を非刺激（ｎｏ　ｓｔｉｍ）のままにするか、又はＣＤ３／ＣＤ２８抗体で２４時間刺激した。導入遺伝子発現は、プロモーターのないベクターで形質導入したＴ細胞における染色強度に対して正規化される。
【図２９Ｃ】Ｔ細胞における誘導性導入遺伝子発現を実証する。ａに示されるベクターで形質導入したＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ（ｂ）及びｔＮＧＦＲ（ｃ）の発現。Ｔ細胞を非刺激（ｎｏ　ｓｔｉｍ）のままにするか、又はＣＤ３／ＣＤ２８抗体で２４時間刺激した。導入遺伝子発現は、プロモーターのないベクターで形質導入したＴ細胞における染色強度に対して正規化される。
【図２９Ｄ】Ｔ細胞における誘導性導入遺伝子発現を実証する。ＥＦＳプロモーターベクターで形質導入したＴ細胞における発現と比較した、ＮＦκＢプロモーターベクターで形質導入したＴ細胞における導入遺伝子発現。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
養子細胞療法のための自己患者Ｔ細胞の操作は、いくつかのタイプのがんの治療に大変革をもたらしている[1]。しかしながら、奏効率及び治癒率を増加させるために、更になる改善が必要とされている。ＣＲＩＳＰＲベースの機能喪失スクリーニングは、Ｔ細胞機能の負の調節因子[2－4]に限定されており、ゲノムの恒久的な改変に起因する安全性の懸念を引き起こす。ここで、本発明者らは、約１２，０００個のバーコード化ヒトオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の過剰発現を通じて、Ｔ細胞機能の正の調節因子を特定する。トップランクの遺伝子は、初代ヒトＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞の増殖及び活性化、並びにインターロイキン－２及びインターフェロン－γなどの主要サイトカインのそれらの分泌を増加させた。加えて、本発明者らは、ＯＲＦ操作Ｔ細胞におけるトランスクリプトーム及び表面抗原の高スループット定量化のため、単一細胞ゲノミクス方法であるＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを開発した。トップランクのＯＲＦ－リンホトキシン－β受容体（ＬＴＢＲ）－は、典型的には骨髄細胞において発現されるが、リンパ球には存在しない。Ｔ細胞において過剰発現されると、ＬＴＢＲは、大規模な転写的及びエピゲノムのリモデリングを誘導し、標準的なＮＦ－κＢ経路の構成的活性化を通じて、長期刺激設定における増加したＴ細胞エフェクター機能及び疲弊に対する耐性をもたらす。ＬＴＢＲ及び他の高くランク付けられた遺伝子は、キメラ抗原受容体Ｔ細胞及びγδＴ細胞の抗原特異的応答を改善し、将来のがん種横断的療法の可能性を強調した[5]。本発明者らの結果は、合成細胞プログラムの誘導によって次世代Ｔ細胞療法を改善するためのいくつかの戦略を提供する。

【００２６】
本明細書で別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって、及び本出願で使用されている多くの用語に対して当業者に一般的な手引きを提供する公開された文書を参照することによって、一般的に理解されているものと同じ意味を有する。
【００２７】
本明細書及び特許請求の範囲全体を通して使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語、及びその変形は、他の成分、エレメント、整数、ステップなどを含む。逆に、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ）」という用語及びその変形は、他の成分、エレメント、整数、ステップなどを除外する。
【００２８】
「ａ」又は「ａｎ」という用語は、１つ以上を指し、例えば、「Ｔ細胞（ａ Ｔ ｃｅｌｌ）」は、１つ以上のＴ細胞を表すと理解されることを留意されたい。したがって、「１つ（ａ）」（又は「１つ（ａｎ）」）、「１つ以上」、及び「少なくとも１つ」という用語は、本明細書では互換的に使用される。
【００２９】
本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別途指定されない限り、与えられた参照からプラス又はマイナス１０％の変動を意味する。
【００３０】
更に、「及び／又は」という用語は、本明細書で使用される場合、他方を伴うか若しくは伴わない２つの特定の特徴又は構成要素の各々の具体的な開示として理解されるべきである。したがって、本明細書の「Ａ及び／又はＢ」などの語句で使用される「及び／又は」という用語は、Ａ及びＢ、Ａ又はＢ、Ａ（単独）、及びＢ（単独）を含むことが意図される。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／又はＣ」などの語句で使用される「及び／又は」という用語は、以下の態様の各々を包含することが意図される：Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、又はＣ；Ａ又はＣ；Ａ又はＢ；Ｂ又はＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；並びにＣ（単独）。
【００３１】
「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態におけるデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）及びそれらのポリマーを指す。特に限定されない限り、本用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の手段で代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に改変されたバリアント（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オーソログ、ＳＮＰ、及び相補的な配列、並びに明示的に示される配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つ以上の選択された（又は全ての）コドンの第３の位置が、混合した塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る（Ｂａｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９：５０８１（１９９１）、Ｏｈｔｓｕｋａ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：２６０５－２６０８（１９８５）、及びＲｏｓｓｏｌｉｍ ｅｔ ａｆ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ ８：９１－９８（１９９４））。
【００３２】
「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、又は「ポリヌクレオチド配列」という用語は、互換的に使用され、連続した核酸配列を指す。配列は、一本鎖若しくは二本鎖のＤＮＡ又はＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡのいずれかであることができる。
【００３３】
本明細書に記載の核酸は、日常的な分子生物学技術を使用してクローニングすることができ、又はＤＮＡ合成によってデノボで生成することができ、このことは、ＤＮＡ合成及び／又は分子クローニングの分野で事業を有するサービス企業（例えば、ＧｅｎｅＡｒｔ

、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｅｕｒｏｆｉｎｓ）によって日常的な手順を使用して行うことができる。本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ編集システムの態様をコードする核酸配列は、組み立てられ、例えば、非ウイルス送達系（例えば、ＲＮＡに基づく系、ネイキッドＤＮＡなど）を生成するために、若しくはパッケージング宿主細胞内でウイルスベクターを生成するために、及び／又は対象の宿主細胞に送達するために、任意の好適な遺伝子エレメント、例えば、ネイキッドＤＮＡ、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソームなどに配置され、それらに担持される配列を宿主細胞に導入する。特定の実施形態では、遺伝子エレメントは、ベクターである。一実施形態では、遺伝子エレメントは、プラスミドである。かかる操作された構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技術を含む。例えば、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（２０１２）を参照されたい。

【００３４】

本発明の文脈において定義されるタンパク質又はペプチドの「バリアント」が生成され得、１つ以上の置換、挿入、及び／又は欠失したアミノ酸（複数可）などの１つ以上の変異で、元の配列と異なるアミノ酸配列を有する。好ましくは、これらの断片及び／又はバリアントは、全長ネイティブタンパク質と比較して同じ生物学的機能又は特異的活性、例えば、その特異的阻害特性を有する。本発明の文脈において定義されるタンパク質又はペプチドの「バリアント」は、それらのネイティブな、すなわち、非変異の生理学的な配列と比較して、保存的アミノ酸置換（複数可）を含み得る。アミノ酸が、同じクラスに由来するアミノ酸同士で交換される置換は、保存的置換と呼ばれる。特に、これらは、脂肪族側鎖、正又は負に荷電した側鎖、側鎖又はアミノ酸内に芳香族基、水素結合に入ることができる側鎖、例えば、ヒドロキシル機能を有する側鎖を有するアミノ酸である。これは、例えば、極性側鎖を有するアミノ酸が、同様に極性側鎖を有する別のアミノ酸によって置き換えられるか、又は例えば、疎水性側鎖を特徴とするアミノ酸が、同様に疎水性側鎖を有する別のアミノ酸によって置換される（例えば、トレオニン（セリン）によるセリン（トレオニン）又はイソロイシン（ロイシン）によるロイシン（イソロイシン））ことを意味する。挿入及び置換は、特に、三次元構造に変更を引き起こさないか、又は結合領域に影響を及ぼさない、それらの配列位置で可能である。挿入（複数可）又は欠失（複数可）による三次元構造への変更は、例えば、ＣＤスペクトル（円二色性スペクトル）を使用して容易に決定することができる（Ｕｒｒｙ，１９８５，Ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ，Ｃｉｒｃｕｌａｒ Ｄｉｃｈｒｏｉｓｍ ａｎｄ ＯＲＤ ｏｆ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｉｎ：Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（ｅｄ．），Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ）。バリアントはまた、非天然アミノ酸を含み得る。

【００３５】

タンパク質又はペプチドの「バリアント」は、かかるタンパク質又はペプチドの１０、２０、３０、５０、７５、１００個若しくはそれ以上のアミノ酸の伸長にわたって、あるいはタンパク質又はペプチドの全長にわたって、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有し得る。

【００３６】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の産生又はコード化に関与するＤＮＡのセグメントを指すことができる。これは、コード領域（リーダー及びトレーラー）の前及び後の領域、並びに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含み得る。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「コード領域」及び「コードする領域」という用語、並びにその文法的変形は、発現時にポリペプチド又はタンパク質をもたらすポリヌクレオチド

内のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を指す。

【００３８】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。本明細書で使用される場合、本用語は、全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含し、アミノ酸残基は、共有ペプチド結合によって連結される。

【００３９】

「コードする」という用語は、ヌクレオチドの定義された配列（すなわち、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、及びｍＲＮＡ）又はアミノ酸の定義された配列のいずれか、及びそれらからもたらされる生物学的特性を有する、生物学的プロセスにおける他のポリマー及び巨大分子の合成のための鋳型として機能する、遺伝子、ｃＤＮＡ、又はｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。したがって、遺伝子、ｃＤＮＡ、又はＲＮＡは、その遺伝子に対応するｍＲＮＡの転写及び翻訳が、細胞又は他の生物学的システムにおいてタンパク質を産生する場合、タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がｍＲＮＡ配列と同一であり、通常は配列表に提供されるコード鎖と、遺伝子又はｃＤＮＡの転写のための鋳型として使用される非コード鎖との両方は、その遺伝子又はｃＤＮＡのタンパク質又は他の産物をコードしていると呼ぶことができる。

【００４０】

別途指定されない限り、「アミノ酸配列をコードする核酸配列」は、互いに縮重形式であり、同じアミノ酸配列をコードする全ての核酸配列を含む。タンパク質をコードする核酸配列又はＲＮＡはまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいくつかの形式でイントロン（複数可）を含有し得る範囲でイントロンを含み得る。

【００４１】

「発現」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、ＲＮＡの産生、タンパク質の産生、又はＲＮＡ及びタンパク質の両方の産生を含む。発現は、一過性であり得るか、又は安定的であり得る。

【００４２】

「発現すること」及び「過剰発現」という用語は、遺伝子又はタンパク質の発現を増加させることを指す。本用語は、発現における増加、例えば、Ｔ細胞、他のリンパ球、又は宿主細胞におけるｍＲＮＡ又は発現されたタンパク質の量における、参照対照のレベルと比較して、少なくとも約１０％の増加、又は少なくとも約２０％、若しくは少なくとも約３０％、若しくは少なくとも約４０％、若しくは少なくとも約５０％、若しくは少なくとも約６０％、若しくは少なくとも約７０％、若しくは少なくとも約８０％、若しくは少なくとも約９０％、若しくは少なくとも約１００％、若しくは少なくとも約２００％、若しくは少なくとも約３００％、若しくは少なくとも約４００％の増加を指す。発現及び／又は過剰発現のための様々な方法は、当業者に既知であり、細胞内で発現及び／若しくは過剰発現されるタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチド（すなわち、表１に示される遺伝子）を安定的若しくは一過性に導入すること、又は細胞内でタンパク質をコードする内因性遺伝子の発現若しくは過剰発現を誘導することを含むが、これらに限定されない。表１に示される１つ以上の遺伝子が、細胞内で発現及び／又は過剰発現され得ることを理解されたい。また、細胞内で発現及び／又は過剰発現される２つ以上の遺伝子が、表１に示される遺伝子のうちの１つ以上から選択することができることも理解される。

【００４３】

「自己」という用語は、後に再導入される対象と同じ対象に由来する任意の材料を指す。

【００４４】

「外因性」という用語は、生物、細胞、組織、若しくは系から導入されるか、又はその外部で産生される任意の材料を指す。

【００４５】

「発現ベクター」という用語は、発現されるヌクレオチド配列に操作可能に連結された

発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用エレメントを含み、発現のための他のエレメントは、宿主細胞又はインビトロ発現系によって供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを取り込む、コスミド、プラスミド（例えば、ネイキッドであるか又はリポソームに含有される）、及びウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）などの当該技術分野で既知の全てのものが含まれる。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」は、１つ以上のＯＲＦ又は遺伝子、例えば、エフェクター増強遺伝子、又はＣＡＲ若しくはＴＣＲあるいはそれらの構成要素をコードする核酸分子を指す。発現カセットはまた、プロモーターを含有し、宿主細胞における遺伝子編集システムの１つ以上のエレメントの発現を制御する追加の調節エレメントを含有し得る。一実施形態では、発現カセットは、ウイルスベクターのカプシド（例えば、ウイルス粒子）にパッケージングされ得る。一実施形態では、本明細書に記載されるウイルスベクターを生成するためのかかる発現カセットは、ウイルスゲノムのパッケージングシグナル及び本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列によって隣接される。

【００４７】

「調節エレメント」又は「調節配列」という用語は、目的の核酸配列と連続している発現制御配列、及び目的の核酸配列を制御するようにトランス又は離れて作用する発現制御配列を指す。本明細書に記載される場合、調節エレメントは、プロモーター、エンハンサー、転写因子、転写終結因子、スプライシング及びポリアデニル化シグナル（ポリＡ）などの効率的なＲＮＡプロセシングシグナル、細胞質ｍＲＮＡを安定化させる配列、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス（ＷＨＰ）転写後調節因子（ＷＰＲＥ）、翻訳効率を向上させる配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）、タンパク質安定性を増強する配列、並びに所望の場合、コードした生成物の分泌を高める配列を含むが、これらに限定されない。また、Ｇｏｅｄｄｅｌ；Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）を参照されたい。調節配列には、多くのタイプの標的細胞での核酸配列の構成的発現を指示するもの、及び特定の標的細胞のみでの核酸配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的制御配列）が含まれる。

【００４８】

「プロモーター」は、核酸の転写を指示する１つ以上の核酸制御配列として定義される。本明細書で使用される場合、プロモーターは、転写の開始部位の近くに必要な核酸配列、例えば、ポリメラーゼＩＩ型プロモーターの場合、ＴＡＴＡエレメントを含む。プロモーターはまた、任意選択的に、転写の開始部位から数千塩基対ほど離れて位置し得る遠位エンハンサー又はリプレッサーエレメントを含む。プロモーターを指す場合、「構成的」という用語は、遺伝子産物をコードするか又は特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結されたとき、細胞のほとんど又は全ての生理学的条件下で、細胞で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を特定する。プロモーターを指す場合、「誘導性」又は「調節可能」という用語は、遺伝子産物をコード又は特定するポリヌクレオチドと操作可能に連結されたとき、プロモーターに対応するインデューサーが細胞内に存在する場合にのみ、実質的に細胞で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を特定する。特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、Ｔ細胞刺激に応答して活性化される。特定の実施形態では、プロモーターは、ＮＦＡＴ、ＡＰ１、ＮＦκＢ、又はＩＲＦ４プロモーターである。プロモーターを指す場合、「組織特異的」という用語は、遺伝子によってコード又は特定されるポリヌクレオチドと操作可能に連結されたとき、細胞がプロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、実質的に細胞で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を特定する。追加のプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターは、同様に開始部位の下流に機能的エレメントを含有することが示されている。プロモーターエレメント間の間隔はしばしば柔軟性があり、その結果、エレメ

ントが互いに対して反転又は移動するときに、プロモーター機能が保存される。チミジンキナーゼ（ｔｋ）プロモーターでは、活性が低下し始める前に、プロモーターエレメント間の間隔を５０ｂｐ離して増加させることができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、協調的又は独立してのいずれかで機能して、転写を活性化することができるように見える。例示的なプロモーターとして、ＣＭＶ　ＩＥ遺伝子、ＥＦ－１α、ユビキチンＣ、又はホスホグリセロキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターが挙げられる。

【００４９】

「操作可能に連結された」という用語は、１つ以上の調節配列と、異種核酸配列との間の機能的連結を指し、後者の発現をもたらす。例えば、第１の核酸配列が第２の核酸配列と機能的関係に配置される場合、第１の核酸配列は、第２の核酸配列と操作可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列に操作可能に連結されている。操作可能に連結されたＤＮＡ配列は、互いに連続であることができ、必要に応じて、２つのタンパク質コード領域を連結するために、同じリーディングフレームにある。

【００５０】

「レンチウイルス」という用語は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染することができる点でレトロウイルスの中で独特であり、それらが宿主細胞のＤＮＡにかなりの量の遺伝情報を送達することができるため、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の１つである。ＨＩＶ、ＳＩＶ、及びＦＩＶは全て、レンチウイルスの例である。

【００５１】

特定の実施形態では、１つ以上の遺伝子は、多くが当該技術分野で既知及び利用可能であるベクター又はウイルスベクターによって宿主細胞に送達される核酸配列によってコードされる。一実施形態では、本明細書に記載の発現カセットを含むベクターが提供される。一実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。別の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。「ウイルスベクター」は、目的の核酸配列を含有する発現カセットが、ウイルスカプシド又はエンベロープにパッケージングされている、合成又は人工のウイルス粒子を指す。ウイルスベクターの例としては、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス（γ－レトロウイルス及びレンチウイルス）、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、バキュロウイルス、単純ヘルペスウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、ウイルスベクターは、複製欠損である。「複製欠損ウイルス」は、ウイルスカプシド又はエンベロープ内にパッケージングされた任意のウイルスゲノム配列が、複製欠損であり、すなわち、それらは、後代ビリオンを生成することができないが、細胞に感染する能力を保持する、ウイルスベクターを指す。

【００５２】

「レンチウイルスベクター」という用語は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指し、特にＭｉｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１７（８）：１４５３－１４６４（２００９）に提供される自己不活性化レンチウイルスベクターを含む。臨床で使用され得るレンチウイルスベクターの他の例としては、例えば、Ｏｘｆｏｒｄ　ＢｉｏＭｅｄｉｃａのＬＥＮＴＩＶＥＣＴＯＲ（登録商標）遺伝子送達技術、ＬｅｎｔｉｇｅｎのＬＥＮＴＩＭＡＸ（商標）ベクターシステムなどが挙げられるが、これらに限定されない。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者に既知であろう。

【００５３】

特定の実施形態では、ベクターは、本明細書に記載の発現カセット、例えば、ネイキッドＤＮＡ、ネイキッドプラスミドＤＮＡ、ＲＮＡ、及びｍＲＮＡを含む非ウイルスプラスミドであり、例えば、ミセル、リポソーム、カチオン性脂質－核酸組成物、ポリ－グリカン組成物及び他のポリマー、脂質及び／又はコレステロール系－核酸コンジュゲート、並びに本明細書に記載のものなどの他の構築物を含む、様々な組成物及びナノ粒子と結合されている。例えば、Ｘ．Ｓｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ，２０

１１，８（３），ｐｐ　７７４－７８７；ｗｅｂ　ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ：Ｍａｒｃｈ　２１，２０１１、ＷＯ２０１３／１８２６８３、ＷＯ２０１０／０５３５７２、及びＷＯ２０１２／１７０９３０を参照されたく、これらの全てが参照により本明細書に組み込まれる。

【００５４】

本発明に従って使用することができるプラスミド、他のクローニング及び発現ベクター、それらの特性、並びにそれらの構築／操作方法は、当業者には容易に明らかである。一実施形態では、本明細書に記載される発現カセットは、ウイルスベクターを生成するため、及び／又は宿主細胞への導入のために有用な、そこに担持された配列を移入する好適な遺伝子エレメント（ベクター）、例えば、ネイキッドＤＮＡ、ファージ、トランスポゾン、コスミド、エピソームなどの中に操作される。選択したベクターは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム送達、膜融合技法、高速ＤＮＡコーティングペレット、ウイルス感染、及びプロトプラスト融合を含む、任意の好適な方法によって送達され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における当業者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技法が挙げられる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹを参照されたい。

【００５５】

「トランスフェクトされた」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入又は導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされているものである。細胞は、初代対象細胞及びその子孫を含む。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「一過性」は、時間、日、又は週の期間では組み込まれない導入遺伝子の発現を指し、この発現の期間は、ゲノムに組み込まれたか、又は宿主細胞における安定なプラスミドレプリコン内に含められた場合、遺伝子の発現の期間未満である。

【００５７】

ＲＮＡ又はＤＮＡは、例えば、エレクトロポレーション（Ａｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ－ＩＩ（Ａｍａｘａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ））、（ＥＣＭ８３０（ＢＴＸ）（Ｈａｒｖａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．）、又はＧｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ（ＢｉｏＲａｄ，Ｄｅｎｖｅｒ，Ｃｏｌｏ．）、Ｍｕｌｔｉｐｏｒａｔｏｒ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ，Ｈａｍｂｕｒｇ　Ｇｅｒｍａｎｙ）、リポフェクションを使用するカチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション、ポリマーカプセル化、ペプチド媒介性トランスフェクション、又は「遺伝子銃」などの微粒子銃粒子送達システムが含まれるが、これらに限定されない商業的に入手可能な方法などの多くの異なる方法のうちのいずれかを使用して標的細胞中に導入することができる（例えば、Ｎｉｓｈｉｋａｗａ，ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１２（８）：８６１－７０（２００１）を参照）。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、哺乳動物を意味し、ヒト、獣医学用動物若しくは農業用動物、家庭用動物若しくは愛玩動物、又は臨床研究に通常使用される動物が含まれる。一実施形態では、これらの方法及び組成物の対象は、ヒトである。更に他の好適な対象としては、限定されないが、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、非ヒト霊長類などが挙げられる。本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、「患者」と互換的に使用される。

【００５９】

組成物

Ｔ細胞の生存、増殖、及び／又はエフェクター機能（本明細書では「エフェクター増強遺伝子」と総称される）を増強することが示されている遺伝子をコードする配列を含む核

酸、発現カセット、及び／又はリンパ球を含む組成物が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子は、以下の表１に特定される遺伝子のうちのいずれかを含む。

【表１－１】

表１

遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名
RPLP1	PRTN3	KDSR	RHEX	ACP2
EMC10	RRAGB	MEI1	MAGEA12	PLPPR2
SFTPC	PFKFB4	C1orf210	BOLL	BDKRB2
PSMB1	PDLIM3	GSTK1	CLEC19A	IFITM3
SEC61G	GPN3	SPATS1	NLRP5	IDH3B
PRAP1	PRSS48	ACSM5	LGALS12	SYS1
KLK11	ARMC7	TAZ	PDXK	IFNA21
TSPAN1	OR1D5	IFT81	PRR19	ADPRS
HDHD2	UBE2D1	IL27	TRAF2	SULT1C4
CCR4	MAPK3	GTF3C6	PEX11A	ASMTL
PAFAH1B3	LRRC29	CEP43	VASH1	TANK
THRA	CD59	RUVBL2	TMEM263	RPL13A
SNAPIN	GJB7	PRND	LRP5L	IL10
CBX8	MEIS3	TAFA2	DAND5	PSG1
TMEM43	PKLR	PDK4	SLC52A1	TMIGD1
CELA1	SZRD1	TMEM44	COMMD8	SLC23A3
DBI	GTPBP8	NRBP2	NOL6	CDC42
RIMS3	HLA-DOA	RTBDN	CA12	FBXL2
RPL29	SPPL2C	FKBP1A	CTPS2	SEMA4G
SLC37A4	LTBR	EDDM3A	CALML3	ARSJ
IGHV7-81	VSTM1	TRMT12	FHIT	WAS
FGL1	EXOSC5	TFF1	LTA4H	DPH1
PRSS8	TIMMDC1	FNDC8	UBL4B	H2AC6
HEMK1	DYRK4	TLE1	OR10G3	ADH4
UBE2A	CRADD	UHMK1	SNURF	ZNF830
IFNL2	SPIC	RAD51C	GPR37L1	RNF11
CZIB	DHX40	ETFBKMT	TSHB	PIEZO1
HNRNPK	SLC10A7	TARBP2	F2RL2	APTX
OXA1L	TIMP4	LENG1	SNAPC5	ALKBH3
KIAA0930	HSFX3	CLN6	TXN	LRRC71
SLC39A1	TRH	CCDC137	MID2	IGSF10
METTL7B	CUTA	GNPDA1	ADAT2	H3C10
WDR70	CDK17	QTRT1	RAB8A	MMP2
GLYCTK	HADH	ZCCHC12	EID3	ZMYM3
C11orf16	RAN	FBXO6	BATF	CD1B
ASB6	ACTL8	PGAP2	DCT	RIT2
F2RL1	LIG3	SMOC1	DTNA	GOSR2
AHNAK	OSM	FBXO30	ELN	CDK2
KRTAP19-5	NFYB	CST8	CNOT2	HMHB1
TPI1	RNF186	BAX	CALCB	TRPV2
AHSA1	RAB24	S100A8	MAB21L2	YPEL4
POLG2	RPL14	VWC2L	GRIK2	CAMKMT

【表１－２】

遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名
SLC39A4	TMEM107	PPP1R2B	PLSCR1	MYL4
CPSF4	TRIM36	HEPACAM2	RASGEF1A	CERS4
RNF114	TIMM8B	CYP27A1	GALNT3	RAP1A
DCLRE1B	EMP3	FCF1	H2AC14	ZNF689
PLA2G1B	CCNE1	TESC	ITM2A	DECR2
HOXA6	NFIC	RPP30	GPR3	TNFAIP8
EXOSC1	NNAT	EVA1C	ATP5MPL	COPS8
GPHB5	S100A9	GLT1D1	SLC25A48	DHRSX
VRK2	TMEM134	KCNA4	LIN37	H2BC21
ADAM2	CENPW	CTRB1	PDP2	OR3A2
HLF	POU4F3	MRPL50	XIAP	DRAP1
UBE2D4	S1PR3	HSD17B7	SELENOH	RASSF1
KCNJ12	SPAG11A	IL1RN	SUN5	S100A7
NCR3	CHMP2A	APBB1IP	YIF1A	CABLES1
SPRR2B	ECT2	USP24	TBRG4	TP53
NMS	IFRD2	LHFPL5	TGIF1	CCL13
ENHO	PWP1	HSD11B2	MASP2	TUBB
APEX2	MS4A3	SLC7A11	MIF4GD	IL31
SRP9	FANCC	TRIM51	PATE1	GLYAT
RORA	TOR1AIP2	OR1N2	S100A11	TAAR5
KLK2	MRFAP1L1	GPD1	EDC3	LRRC25
KLK15	HCFC2	CRHBP	OR6B2	GSK3B
HOGA1	C1D	SYNGR2	ALDH1A3	ITIH1
HAAO	CSF3	SERPINB4	MRPL17	CTSE
SWSAP1	CLIC1	RSKR	ENPP1	ASCL3
TMEM205	CDA	PEX12	GTF2B	CSH1
OR10W1	PCP2	SLC1A7	ANGPT4	IL23A
STK25	MRPS12	HHLA3	CDCP2	VGLL3
PPP1R8	SKAP1	DOK6	P2RY6	LAMTOR1
WDFY1	GPATCH11	AFTPH	KLRD1	PODXL2
LARS2	MORN4	DDIT4	POFUT1	PPIC
WDTC1	GPNMB	STAU2	PCMTD1	LSM1
RALB	C5orf24	TBCCD1	MAPRE3	PTPN7
CAPNS2	PGS1	TMED9	CTRB2	STPG2
AKAP7	TRIM74	RPL30	HAVCR2	ASB1
SLC4A4	SSX3	MC3R	BCL7A	BRWD1
CSRP1	ANXA9	FAM216A	SLC25A39	TPPP3
ZCRB1	DUPD1	ZNF232	PRDX5	ACSM3
EDA	DCUN1D3	GGCX	TEX35	EXOSC4
RASGEF1C	XAGE3	EIF1AY	SOSTDC1	PAGE5
POU2F2	RBIS	SYT10	REEP4	MRPL18
NELFE	SH3RF3	C16orf70	ANAPC16	HSPBAP1

【表１－３】

遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名
TSPAN31	THNSL1	CPXM2	FOSB	TNIP1
FUT10	RTL8C	PTRH2	GAK	MAPRE2
DKC1	GABRB1	AGAP1	NPY	MMP16
CGB2	IFNE	CA2	SLC25A4	HUWE1
TM2D2	CD14	MATN1	F11R	IL12B
AHCY	ESM1	PRR15L	ABHD14B	SIRT5
FAM71F2	TIRAP	WDR1	AKR1C4	GALP
RHBDD2	ING3	PELI2	CKMT1A	SMIM14
RRAGA	PELI1	IFTAP	SLC31A2	MTG1
DPEP2	GDAP1	PSMD4	PPP2R5E	NELFCD
BANF2	PACC1	CRIP1	DEFB135	LRAT
FMO4	CXCL12	C3AR1	PAX9	LCN10
LYPD4	SUMO3	DEFB132	CLEC3A	COX7A2L
MGAT4D	PRG3	VAMP2	MOB3C	TTC9C
NMU	DAB1	GFAP	MLLT11	BOD1L1
CCBE1	SEC31A	CRYBA1	SLC14A1	KRTAP3-3
SRGN	CEP112	HAUS1	WFDC3	TMEM126A
SDC4	SAMSN1	SERAC1	DOK1	WDR77
CD244	PKIB	SLC17A4	RNASEH2B	RPL21
TBC1D20	IQCD	GUCA2A	ROGDI	ELF2
LDHC	PHPT1	ORM2	ATF6B	PYGB
HPCAL1	LRRC8D	NAGK	WDR62	HCST
SNCB	OR4K17	SRSF12	TCEAL7	NIT1
BNIPL	PSMB6	OCEL1	CRLF2	RALGPS2
OR52W1	ENPP3	WDR4	PLA2G12A	HAPLN3
MRPL51	SNRK	B3GAT3	CDK1	AMIGO3
DMAP1	NBR1	TRAPPC6A	GHITM	DYNAP
RPL18	ETFA	MRPL53	ARL11	HPRT1
CISH	UHRF2	KRT14	POLR2C	OR10X1
TRIM5	OLFM1	OTX1	KIF26B	YARS2
LRTM1	RAB27B	NEIL2	UBQLN3	REEP3
LAMP2	TNFSF14	AK3	ZNF706	ZDHHC5
TMEM37	HEATR9	TMPRSS6	TMEM143	DDIT3
FAM180A	RNF5	LAPTM5	CTSW	TMEM189
RSPO1	MKNK1	GRPEL1	CDC25C	UBE2M
TWIST2	SMAP1	HMCES	C2orf73	PPP2R2B
CGGBP1	BIN3	GRID1	FSCB	ACBD4
PHF23	TAC1	PRSS37	THEM4	BEX3
DEFB134	SELENOW	INSL5	PSMA2	SLC35C2
CHST4	NACA	EME1	LAD1	MPDU1
DCK	PTCHD1	SPINK9	SPANXN5	TRIM47
MRPS21	STX8	WDR20	FAM78A	CLDN14

【表１－４】

遺伝子名	遺伝子名	遺伝子名
UTP4	TRIP6	JAGN1
MRPL49	CA11	GPR17
MIER2	DBF4B	LETM1
PSMD3	PFN4	SLC26A5
PIFO	BBS1	REXO2
SLC39A11	H2BC15	IL18RAP
OR13G1	H6PD	EOLA2
INSIG2	R3HDM4	DUS1L
OR2H1	SNRPA	TMEM182
BMPER	TRIM22	SMU1
HP1BP3	SUPT4H1	FXYD1
QPRT	DIMT1	CCL17
SGCA	TEX38	STX1A
CASTOR1	CCDC127	UBXN1
AGPAT4	SSMEM1	POLD3
ZDHHC6	IRF4	TRPV5
C8orf37	OR2M4	KRT20
C6orf141	MYL6	FAM32A
CD3E	SHFL	HOMER1
CA5B	SCG5	
TRMT44	CORO2B	
PRB3	PPIG	
AK2	RNF185	
LMBRD1	CEP20	
EIF4E3	SPINT4	
ADAP2	MLX	
CNR2	BRD2	
PLD3	DERL1	
RNF182	TEX12	
STMN2	SLFN5	
PCSK4	TNFSF18	
IRX6	PHKG1	
ADA	PYCR2	
SMCP	CALML5	
UPP2	MDFI	
LMAN2L	CHGB	
PDCD1	SPIB	
RACK1	C2CD4B	
PGLYRP1	ARHGAP28	
GNB1L	APCDD1	
DDX49	MRPL15	
TMEM68	WNT7B	

【００６０】

発現カセット及びそれを含有する含む細胞

１つ以上のエフェクター増強遺伝子をコードする核酸配列を含む発現カセットが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、遺伝子は、上記の表１に特定される遺伝子、又はその断片若しくはバリアントのうちのいずれかを含む。他の実施形態では、遺伝子は、以下の表２に特定される遺伝子、又はその断片若しくはバリアントのうちのいずれかを含む。特定の実施形態では、発現カセットは、２つ以上のエフェクター増強遺伝子、又はその断片若しくはバリアントを含む。また、本明細書に記載の核酸及び発現カセットを含有する宿主細胞が提供される。特定の実施形態では、宿主細胞は、リンパ球である。

本明細書で使用される場合、表１又は表２の特定の遺伝子への言及が記載されている場合、全長タンパク質、欠失若しくは切断を有する断片、又はアミノ酸に１つ以上の置換を有するバリアントにおけるコード配列の使用が意図されることが意図されている。例えば、特定の実施形態では、核酸は、Ｎ末端に欠失又は切断を有するタンパク質配列をコードする。特定の実施形態では、核酸は、Ｃ末端に欠失又は切断を有するタンパク質配列をコードする。一実施形態では、核酸は、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、少なくとも８５、少なくとも９０、少なくとも９５、少なくとも１００、少なくとも１０５、少なくとも１１０、少なくとも１１５、少なくとも１２０、又は少なくとも１２５個のアミノ酸を有するタンパク質をコードする。

【００６１】

一実施形態では、エフェクター増強遺伝子は、ＬＴＢＲである。リンパ球ではなくプロフェッショナル抗原提示細胞によって内因的に発現される受容体であるＬＴＢＲは、Ｔ細胞増殖並びに主要なサイトカイン：ＩＬ－２及びＩＦＮγの分泌の両方の強力な合成ドライバーとして特定された。マルチモーダル単一細胞配列決定アプローチを使用して、ＬＴＢＲが、Ｔ細胞で過剰発現されたときに深刻な転写変化を誘導し、抗原提示及びアポトーシスの予防に関与する細胞プログラムを活性化することが示された。本明細書に記載されるように、目的の遺伝子（例えば、ＬＴＢＲ）を、他の遺伝子を標的とするＣＲＩＳＰＲ

ｓｇＲＮＡとともに共発現させて、Ｔ細胞におけるシグナル伝達ネットワークをマッピングすることによって、Ｔ細胞における組み合わせ摂動を試験するためのプラットフォームが開発された。また、構成的レンチウイルス発現の代替としてのＬＴＢＲのｍＲＮＡ送達が本明細書において示され、本発明者らのスクリーニングアプローチの移行可能性を強調している。

【００６２】

特定の実施形態では、発現カセットは、ＬＴＢＲをコードする核酸、又はその断片を含む。腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー３をコードするＬＴＢＲ（リンホトキシン－ベータ受容体）は、二次リンパ組織の発達及び組織化並びにケモカイン放出に必須である。ＬＴＢＲの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００２３４２．３、配列番号１に見出すことができる。ＬＴＢＲの全長アミノ酸配列は、配列番号２に示される。

【００６３】

ＬＴＢＲタンパク質は、３つの領域又はドメイン：細胞外ドメイン（配列番号２のアミノ酸３１～２２７）、膜貫通（又はヘリカル）ドメイン（配列番号２のアミノ酸２２８～２４８）、及び細胞質（又は細胞内）ドメイン（配列番号２のアミノ酸２４９～４３５）に分けることができる。未成熟タンパク質のシグナルペプチドは、配列番号２のアミノ酸１～３０にある。

【００６４】

特定の実施形態では、発現カセットは、ＬＴＢＲの断片をコードする核酸を含む。特定の実施形態では、核酸は、ネイティブタンパク質（配列番号２）と比較して、アミノ酸２～３１、３２～４１、３２～１５１、３２～１８０、３９３～４３５、３７７～４３５、３２４～３７７、２９７～４３５、又は２６２～４３５の欠失を有するタンパク質配列をコードする。特定の実施形態では、ＬＴＢＲは、ネイティブタンパク質（配列番号２）と比較して、３７８～４３５、３７９～４３５、３８０～４３５、３８１～４３５、３８２～４３５、３８３～４３５、３８４～４３５、３８５～４３５、３８６～４３５、３８７～４３５、３８８～４３５、３８９～４３５、３９０～４３５、３９１～４３５、又は３９２～４３５の欠失を有する。特定の実施形態では、核酸は、Ｎ末端に欠失を有するタンパク質配列をコードする。特定の実施形態では、核酸は、Ｃ末端に欠失を有するタンパク質配列をコードする。一実施形態では、ＬＴＢＲは、残基３９３～４３５の欠失を有する。特定の実施形態では、ＬＴＢＲは、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、

少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、少なくとも８５、少なくとも９０、少なくとも９５、少なくとも１００、少なくとも１０５、少なくとも１１０、少なくとも１１５、少なくとも１２０、又は少なくとも１２５個のアミノ酸の欠失を有する。

【００６５】

特定の実施形態では、発現カセットは、ＬＴＢＲのドメインである断片をコードする核酸を含む。特定の実施形態では、核酸は、ＬＴＢＲの細胞外ドメイン（配列番号２のアミノ酸３１～２２７）をコードする。特定の実施形態では、核酸は、ＬＴＢＲの膜貫通ドメイン（配列番号２のアミノ酸２２８～２４８）をコードする。特定の実施形態では、核酸は、ＬＴＢＲの細胞質（又は細胞内）ドメイン（配列番号２のアミノ酸２４９～４３５）をコードする。他の実施形態では、ドメインは、ＬＴＢＲドメインのうちの１つのバリアントであり、欠失を有するバリアントが含まれる。細胞質ドメインの望ましいバリアントには、配列番号２のアミノ酸２４９～３７８、２４９～３７９、２４９～３８０、２４９～３８１、２４９～３８２、２４９～３８３、２４９～３８４、２４９～３８５、２４９～３８６、２４９～３８７、２４９～３８８、２４９～３８９、２４９～３９０、２４９～３９１、又は２４９～３９２全てを含むものが含まれる。更になる望ましいバリアントには、配列番号２と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５個のアミノ酸置換を有する配列番号２のアミノ酸２４９～３７８、２４９～３７９、２４９～３８０、２４９～３８１、２４９～３８２、２４９～３８３、２４９～３８４、２４９～３８５、２４９～３８６、２４９～３８７、２４９～３８８、２４９～３８９、２４９～３９０、２４９～３９１、又は２４９～３９２全てを含むものが含まれる。

【００６６】

他の実施形態では、発現カセットは、ＬＴＢＲの２つ以上のドメイン又はそれらの断片をコードする核酸を含む。一実施形態では、核酸は、ＬＴＢＲの細胞質ドメイン（又はその断片）及び膜貫通ドメインをコードする。別の実施形態では、核酸は、ＬＴＢＲの細胞質ドメイン（又はその断片）、膜貫通ドメイン、及び細胞外ドメインをコードする。

【００６７】

別の実施形態では、発現カセットは、ＡＨＣＹをコードする核酸を含む。ＡＨＣＹは、Ｓ－アデノシルホモシステイン（ＡｄｏＨｃｙ）からアデノシン（Ａｄｏ）及びＬ－ホモシステイン（Ｈｃｙ）への可逆的加水分解を触媒する、酵素Ｓ－アデノシルホモシステイン加水分解酵素をコードする。ＡＨＣＹの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＸＭ＿０１１５２８６５６．３に見出すことができる。

【００６８】

別の実施形態では、発現カセットは、ＤＵＰＤ１をコードする核酸を含む。ＤＵＰＤ１は、酵素二重特異性ホスファターゼ及びプロイソメラーゼドメイン含有１（ＤＵＳＰ２９－二重特異性ホスファターゼ２９とも呼ばれる）をコードし、同じ基質内でホスホチロシン、ホスホセリン、及びホスホスレオニン残基を脱リン酸化することができる。ＤＵＰＤ１の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＸＭ＿０１１５３９７４７．２に見出すことができる。

【００６９】

別の実施形態では、発現カセットは、ＡＫＲ１Ｃ４をコードする核酸を含む。ＡＫＲ１Ｃ４は、酵素アルド－ケトレダクターゼファミリー１メンバーＣ４（３－アルファ－ＨＳＤ１、ＣＤＲ、及びＤＤ－４とも呼ばれる）をコードし、ケトステロイドのヒドロキシステロイドへのＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨ依存性還元を触媒することができる。ＡＫＲ１Ｃ４の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００１８１８．５に見出すことができる。

【００７０】

別の実施形態では、発現カセットは、ＡＴＦ６Ｂをコードする核酸を含む。ＡＴＦ６Ｂは、活性化転写因子６ベータ（環状ＡＭＰ依存性転写因子ＡＴＦ－６ベータとも呼ばれる

）をコードする。ＡＴＦ－６ベータの処理された形態は、ＥＲストレスによって誘導されたＵＰＲ標的遺伝子を活性化することによって、非フォールド化タンパク質応答経路において作用する。ＡＴＦ６Ｂの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００４３８１．５に見出すことができる。

【００７１】

別の実施形態では、発現カセットは、ＩＴＭ２Ａをコードする核酸を含む。ＩＴＭ２Ａは、アミロイド－ベータに結合する、一体型膜タンパク質２Ａ（タンパク質Ｅ２５とも呼ばれる）をコードする。ＩＴＭ２Ａの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００４８６７．５に見出すことができる。

【００７２】

別の実施形態では、発現カセットは、ＡＨＮＡＫをコードする核酸を含む。ＡＨＮＡＫは、神経芽細胞分化関連タンパク質ＡＨＮＡＫ（ＡＨＮＡＫ核タンパク質とも呼ばれる）をコードする。コードされたタンパク質は、血液脳関門の形成、細胞構造及び移動、心臓カルシウムチャネル調節、及び腫瘍転移などの多様なプロセスで役割を果たし得る。ＡＨＮＡＫの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＸＭ＿０１７０１８２７０．１に見出すことができる。

【００７３】

別の実施形態では、発現カセットは、ＢＡＴＦをコードする核酸を含む。ＢＡＴＦは、免疫系における系統特異的細胞の分化を制御するＡＰ－１ファミリー転写因子である、塩基性ロイシンジッパー転写因子ＡＴＦ様（Ｂ細胞活性化転写因子（Ｂ－ＡＴＦ）及びＳＦ－ＨＴ活性化遺伝子２タンパク質（ＳＦＡ－２）とも呼ばれる）をコードする。ＢＡＴＦの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００６３９９．５に見出すことができる。

【００７４】

別の実施形態では、発現カセットは、ＧＰＤ１をコードする核酸を含む。ＧＰＤ１は、グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ［ＮＡＤ（＋）］，細胞質性（ＧＰＤ－Ｃ及びＧＰＤＨ－Ｃとも呼ばれる）をコードする。ＧＰＤ１の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００５２７６．４に見出すことができる。

【００７５】

別の実施形態では、発現カセットは、ＧＰＮ３をコードする核酸を含む。ＧＰＮ３は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩの適切な局在化に必要とされる小ＧＴＰａｓｅである、ＧＰＮループＧＴＰａｓｅ３（ＡＴＰ結合ドメイン１ファミリーメンバーＣとも呼ばれる）をコードする。ＧＰＮ３の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＸＭ＿０１７０１９３９４．１に見出すことができる。

【００７６】

別の実施形態では、発現カセットは、ＭＲＰＬ５１をコードする核酸を含む。ＭＲＰＬ５１は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩの適切な局在化に必要とされる小ＧＴＰａｓｅである、ＧＰＮループＧＴＰａｓｅ３（ＡＴＰ結合ドメイン１ファミリーメンバーＣとも呼ばれる）をコードする。ＭＲＰＬ５１の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿０１６４９７．４に見出すことができる。

【００７７】

別の実施形態では、発現カセットは、ＤＢＩをコードする核酸を含む。ＤＢＩは、ホルモンによって調節され、脂質代謝並びにベーターカルボリン及びベンゾジアゼピンの置換に関与するタンパク質である、ジアゼパム結合阻害因子（ＡＣＢＤ１、ＡＣＢＰ、ＣＣＫ－ＲＰ、ＥＰとも呼ばれる）をコードする。ＤＢＩの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００１２８２６３５．３に見出すことができる。

【００７８】

別の実施形態では、発現カセットは、ＣＡＬＭＬ３をコードする核酸を含む。ＣＡＬＭＬ３は、ミオシン－１０翻訳を増強するタンパク質である、カルモジュリン様３（ＣＬＰとも呼ばれる）をコードする。ＣＡＬＭＬ３の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００５１８５．４に見出すことができる。

【００７９】
別の実施形態では、発現カセットは、ＩＬ１２Ｂをコードする核酸を含む。ＩＬ１２Ｂは、Ｔ細胞及びナチュラルキラー細胞に作用し、幅広い生物学的活性を有するサイトカインである、インターロイキン１２Ｂ（ＣＬＭＦ、ＣＬＭＦ２、ＩＬ－１２Ｂ、ＩＭＤ２８、ＩＭＤ２９、ＮＫＳＦ、ＮＫＳＦ２とも呼ばれる）をコードする。ＩＬ１２Ｂの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿００２１８７．３に見出すことができる。
【００８０】
別の実施形態では、発現カセットは、ＩＦＮＬ２をコードする核酸を含む。ＩＦＮＬ２は、インターフェロンラムダ２（ＩＬ２８Ａ、ＩＦＮＬ２ａ、ＩＦＮＬ３ａ、ＩＬ－２８Ａとも呼ばれる）をコードする。この遺伝子、インターロイキン２８Ｂ（ＩＬ２８Ｂ）、及びインターロイキン２９（ＩＬ２９）は、１９ｑ１３にマッピングされた染色体領域にサイトカイン遺伝子クラスターを形成する３つの密接に関連したサイトカイン遺伝子である。３つの遺伝子によってコードされるサイトカインの発現は、ウイルス感染によって誘導することができる。３つのサイトカインは全て、インターロイキン１０受容体、ベータ（ＩＬ１０ＲＢ）及びインターロイキン２８受容体、アルファ（ＩＬ２８ＲＡ）からなるヘテロ二量体クラスＩＩサイトカイン受容体と相互作用することが示されている。ＩＦＮＬ２の代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿１７２１３８．２に見出すことができる。
【００８１】
別の実施形態では、発現カセットは、ＡＤＡをコードする核酸を含む。ＡＤＡは、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ１、ＩＦＮＬ２ａ、ＩＦＮＬ３ａ、ＩＬ－２８Ａとも呼ばれる）をコードする。この遺伝子は、プリン異化経路におけるアデノシンのイノシンへの加水分解を触媒する酵素をコードする。ＡＤＡの代表的な核酸配列は、登録ＩＤ　ＮＭ＿０００２２．４に見出すことができる。
【００８２】
上記で特定された遺伝子の様々なアイソフォームが、当技術分野で既知である。いくつかが、以下の表２に記載される。別の実施形態では、代替アイソフォームのいずれかのコード配列を含む発現カセットが提供される。これらの遺伝子について、コドン最適化されたコード配列を含む、遺伝子コードの縮重を説明する代替のコード配列は、当業者によって特定され得、本明細書に記載される組成物及び方法の代替の実施形態として利用され得る。

【表２－１】

表２

遺伝子ID	記号	転写	長さ(nt)	タンパク質	長さ(aa)	アイソフォーム	遺伝子名
100	ADA	NR_136160.2	1431				アデノシンデアミナーゼ
100	ADA	NM_001322050.2	1380	NP_001308979.1	228	2	アデノシンデアミナーゼ
100	ADA	NM_001322051.2	1424	NP_001308980.1	339	3	アデノシンデアミナーゼ
100	ADA	NM_000022.4	1496	NP_000013.2	363	1	アデノシンデアミナーゼ
10538	BATF	NM_006399.5	913	NP_006390.1	125		塩基性ロイシンジッパーATF様転写因子
1109	AKR1C4	NM_001818.5	1192	NP_001809.4	323		アルドケトレダクターゼファミリー1メンバーC4
1388	ATF6B	NM_001136153.2	2617	NP_001129625.1	700	b	活性化転写因子6ベータ
1388	ATF6B	NM_004381.5	2626	NP_004372.3	703	a	活性化転写因子6ベータ
1622	DBI	NM_001282635.3	804	NP_001269564.1	104	1	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_001282636.3	718	NP_001269565.1	63	7	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_001282633.3	680	NP_001269562.1	104	1	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_020548.9	675	NP_065438.1	104	1	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_001178043.4	594	NP_001171514.1	97	6	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_001178041.4	690	NP_001171512.1	129	5	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質
1622	DBI	NM_001282634.3	650	NP_001269563.1	104	1	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA結合タンパク質

【表２－２】

1622	DBI	NM_001178042.4	645	NP_001171513.1	104	1	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA 結合タンパク質
1622	DBI	NM_001079862.4	564	NP_001073331.1	87	3	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA 結合タンパク質
1622	DBI	NM_001352432.3	896	NP_001339361.1	63	7	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA 結合タンパク質
1622	DBI	NM_001178017.3	756	NP_001171488.1	148	4	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA 結合タンパク質
1622	DBI	NM_001079863.3	698	NP_001073332.1	88	2	ジアゼパム結合阻因子、アシル-CoA 結合タンパク質
191	AHCY	XM_011528657.2	1436	XP_011526959.2	434	X1	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_017027709.2	1801	XP_016883198.1	432	X2	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_011528658.3	1798	XP_011526960.2	434	X1	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_011528656.3	1803	XP_011526958.2	434	X1	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_011528659.1	2196	XP_011526961.1	404	X3	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	NM_001161766.2	2368	NP_001155238.1	404	2	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	NM_001362750.2	1774	NP_001349679.1	432	1	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	NM_000687.4	2150	NP_000678.1	432	1	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_017027710.2	2136	XP_016883199.1	306	X4	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	XM_005260317.2	2601	XP_005260374.1	404	X3	アデノシルホモシステイナーゼ

【表２－３】

191	AHCY	NM_001322085.2	3092	NP_001309014.1	404	2	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	NM_001322084.2	3270	NP_001309013.1	404	2	アデノシルホモシステイナーゼ
191	AHCY	NM_001322086.2	3281	NP_001309015.1	434	3	アデノシルホモシステイナーゼ
2819	GPD1	NM_005276.4	2887	NP_005267.2	349	1	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1
2819	GPD1	NM_001257199.2	2818	NP_001244128.1	326	2	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1
282616	IFNL2	NM_172138.2	951	NP_742150.1	200		インターフェロンラムダ 2
338599	DUSP29	XM_011539747.2	4872	XP_011538049.1	220	X1	二重特異性ホスファターゼ 29
338599	DUSP29	NM_001003892.3	1135	NP_001003892.1	220		二重特異性ホスファターゼ 29
338599	DUSP29	NM_001384909.1	1267	NP_001371838.1	220		二重特異性ホスファターゼ 29
338599	DUSP29	XM_017016176.1	1284	XP_016871665.1	112	X2	二重特異性ホスファターゼ 29
3593	IL12B	NM_002187.3	2364	NP_002178.2	328		インターロイキン 12B
4055	LTBR	NM_001270987.2	2276	NP_001257916.1	416	2	リンホトキシンベータ受容体
4055	LTBR	XM_005253688.2	2094	XP_005253745.1	399	X1	リンホトキシンベータ受容体
4055	LTBR	XM_006718983.3	1127	XP_006719046.1	255	X2	リンホトキシンベータ受容体
4055	LTBR	NM_002342.3	2134	NP_002333.1	435	1 前駆体	リンホトキシンベータ受容体
51184	GPN3	NM_001164372.2	1605	NP_001157844.1	323	2	GPN ループ GTPase3
51184	GPN3	NM_016301.4	1457	NP_057385.3	284	1	GPN ループ GTPase3
51184	GPN3	NM_001164373.2	1487	NP_001157845.1	294	3	GPN ループ GTPase3

【表２－４】

51184	GPN3	XM_017019394.1	1357	XP_016874883.1	262	X1	GPN ループ GTPase3
51258	MRPL51	NM_016497.4	898	NP_057581.2	128		ミトコンドリアリボソームタンパク質 L51
79026	AHNAK	NM_024060.4	1036	NP_076965.2	149	2	AHNAK 核タンパク質
79026	AHNAK	NM_001620.3	18761	NP_001611.1	5890	1	AHNAK 核タンパク質
79026	AHNAK	XM_017018270.1	18556	XP_016873759.1	5823	X1	AHNAK 核タンパク質
79026	AHNAK	NM_001346445.2	18697	NP_001333374.1	5890	1	AHNAK 核タンパク質
79026	AHNAK	NM_001346446.2	18713	NP_001333375.1	5890	1	AHNAK 核タンパク質
810	CALML3	NM_005185.4	1811	NP_005176.1	149		カルモジュリン様 3
9452	ITM2A	NM_001171581.2	1484	NP_001165052.1	219	2	内在性膜タンパク質 2A
9452	ITM2A	NM_004867.5	1616	NP_004858.1	263	1	内在性膜タンパク質 2A

【００８３】

他の実施形態では、発現カセットは、表１の遺伝子から選択される遺伝子をコードする核酸を含む。

【００８４】

操作されたＴ細胞受容体

本開示は、Ｔ細胞エフェクター機能を変化させる遺伝子をコードする核酸配列を有するＴ細胞における発現のための、操作されたＴ細胞受容体、例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、本明細書に記載されるように改変されたＴＣＲ、及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸配列を提供する。ＴＣＲ及びＣＡＲの構成要素が、本明細書に更に記載される。

【００８５】
ＴＣＲは、Ｔ細胞リンパ球に存在するジスルフィド結合膜固定化ヘテロ二量体であり、Ｔ細胞の大部分は、アルファ（α）鎖及びベータ（β）鎖からなるＴＣＲを有するαβＴ細胞である。各鎖は、可変（Ｖ）及び定常（Ｃ）ドメインを含み、可変ドメインは、抗原、又はＭＨＣ提示ペプチドを認識する。特定の抗原、例えば、本明細書に記載の腫瘍抗原に対する既知の特異性又は親和性を有するＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖を、本明細書に記載の方法を使用してＴ細胞に導入することができる。特定の抗原に対する所望の、例えば増加した特異性又は親和性を有するＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖は、当該技術分野で既知の標準的な分子クローニング技法を使用して単離することができる。ＴＣＲ又はＴＣＲを発現する操作されたＴ細胞の特異性、親和性、又は機能を増加させる他の改変、例えば、調節された発現のためのプロモーター選択、ＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖の抗原結合領域における変異は、当業者によって容易に想定することができる。任意の単離又は改変されたＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖は、本明細書に記載の１つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインと操作可能に連結することができるか、又は会合することができる。シグナル伝達は、抗原結合αβヘテロ二量体とＣＤ３鎖分子、例えば、ＣＤ３ゼータ（ζ）との間の相互作用を通して媒介され得る。

【００８６】
より小さなサブセットのＴ細胞は、（γ）ガンマ鎖及びデルタ（δ）鎖を有するＴＣＲを発現する。ガンマ－デルタ（γδ）Ｔ細胞は、ヒトにおける循環リンパ球の３～１０％を構成し、Ｖδ２＋サブセットは、血液中のγδＴ細胞の最大９５％を占めることができる。Ｖδ２＋細胞は、非ペプチドエピトープを認識し、主要組織適合性複合体（「ＭＨＣ」）又はヒト白血球抗原（「ＨＬＡ」）による抗原提示を必要としない。大部分のＶδ２＋Ｔ細胞はまた、Ｖγ９鎖を発現し、メバロン酸及び非メバロン酸ステロール／イソプレノイド合成経路における中間体である５－炭素ピロリン酸化合物への曝露によって刺激される。イソペンテニルピロリン酸（５－炭素）に対する応答は、健常なヒトの間で普遍的である。γδＴ細胞の別のサブセットであるＶδ１＋は、血液中で循環するＴ細胞のはるかに小さい割合を構成するが、上皮粘膜及び皮膚に一般的に見出される。γδＴ細胞は、腫瘍細胞及び病原体感染細胞を殺滅することを含むいくつかの機能を有する。γδＴＣＲを介した刺激は、細胞傷害性、サイトカイン分泌、及び他のエフェクター機能のための能力を改善する。γδＴ細胞のＴＣＲは独自の特異性を有し、細胞それら自体は高いクローン頻度で発生し、したがって、腫瘍及び病原体に対する迅速な先天性応答を可能にする。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｐａｒｋ ａｎｄ Ｌｅｅ，Ｅｘｐ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．２０２１ Ｍａｒ；５３（３）：３１８－３２７を参照されたい。

【００８７】
特定の実施形態では、Ｔ細胞は、ＴＣＲ、例えば、本明細書に記載の腫瘍抗原を標的とする改変ＴＣＲをコードする核酸配列、及び遺伝子をコードする核酸配列を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、ＴＣＲを本明細書に記載のＣＡＲに置き換えてＴ細胞を生成することができる。本明細書に記載の操作されたＴＣＲは、本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、ＣＡＲに置き換えることができる。特定の実施形態では、ＮＹ－ＥＳＯ－１（配列番号２３及び２４）を標的とする操作されたＴＣＲ（例えば、Ｔｈｏｍａｓ ｅｔ ａｌ．，ＮＹ－ＥＳＯ－１ Ｂａｓｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ，Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，０１ Ｍａｙ ２０１８を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる）。

【００８８】
特定の実施形態では、Ｔ細胞は、図２０に特定されるＴＣＲを含む。特定の実施形態では、ＴＣＲは、ＭＡＲＴ－１を標的とする。Ｃｈｏｄｏｎ Ｔ，ｅｔ ａｌ，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｏｆ ＭＡＲＴ －１ Ｔ － ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ａｎｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｍｅｔａｓｔａｔｉ

ｃ ｍｅｌａｎｏｍａ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１４ Ｍａｙ １；２０（９）：２４５７－６５．ｄｏｉ：１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１３－３０１７．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｍａｒ １４．ＰＭＩＤ：２４６３４３７４；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ４０７０８５３。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＭＡＧＥ Ａ４を標的とする。Ｈｏｎｇ ｅｔ ａｌ，Ｐｈａｓｅ Ｉ ｄｏｓｅ ｅｓｃａｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｔｒｉａｌ ｔｏ ａｓｓｅｓｓ ｔｈｅ ｓａｆｅｔｙ ａｎｄ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｏｆ ＡＤＰ－Ａ２Ｍ４ ＳＰＥＡＲ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ａｄｖａｎｃｅｄ ｓｏｌｉｄ ｔｕｍｏｒｓ．ＡＳＣＯ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｌｉｂｒａｒｙ，２０２０ ＡＳＣＯ Ｖｉｒｔｕａｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｒｏｇｒａｍ，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ ３８：２０２０（ｓｕｐｐｌ；ａｂｓｔｒ １０２）。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＷＴ１を標的とする。Ｃｈａｐｕｉｓ ＡＧ，ｅｔ ａｌ．Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＷＴ１ ｐｒｅｖｅｎｔｓ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｒｅｌａｐｓｅ ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０１９ Ｊｕｌ；２５（７）：１０６４－１０７２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１５９１－０１９－０４７２－９．Ｅｐｕｂ ２０１９ Ｊｕｎ ２４．ＰＭＩＤ：３１２３５９６３；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ６９８２５３３。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＭＲ１を標的とする。Ｃｒｏｗｔｈｅｒ，Ｍ．Ｄ．，Ｄｏｌｔｏｎ，Ｇ．，Ｌｅｇｕｔ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｒｅｖｅａｌｓ ｕｂｉｑｕｉｔｏｕｓ Ｔ ｃｅｌｌ ｃａｎｃｅｒ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｖｉａ ｔｈｅ ｍｏｎｏｍｏｒｐｈｉｃ ＭＨＣ ｃｌａｓｓ Ｉ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ＭＲ１．Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２１，１７８－１８５（２０２０）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５９０－０１９－０５７８－８。他の実施形態では、ＴＣＲは、Ｅ６を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、Ｅ７を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＫＫ－ＬＣ－１を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＮＹ－ＥＳＯ－１を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＭＡＧＥ Ａ３を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＧＤ－２を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、Ｐ５３を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＬＡＧＥ－Ａ１を標的とする。他の実施形態では、ＴＣＲは、ＧＰ１００を標的とする。

【００８９】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

「キメラ抗原受容体」又は代替的に「ＣＡＲ」という用語は、少なくとも細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、以下に定義される刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（細胞内シグナル伝達ドメインとも呼ばれる）と、を含む、組換えポリペプチド構築物を指す。

いくつかの実施形態では、刺激分子は、ＴＣＲゼータ、ＦｃＲガンマ、ＦｃＲベータ、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ６６ｄ、４－１ＢＢ、又はＣＤ３ゼータである。特定の実施形態では、刺激分子は、Ｔ細胞受容体複合体と会合するゼータ鎖である。特定の実施形態では、刺激分子は、４－１ＢＢである。特定の実施形態では、刺激分子は、ＣＤ２８である。特定の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、以下に定義される少なくとも１つの共刺激分子に由来する１つ以上の機能的シグナル伝達ドメイン（「共刺激シグナル伝達ドメイン」とも呼ばれる）を更に含む。特定の実施形態では、共刺激分子は、本明細書に記載の共刺激分子、例えば、ＯＸ４０、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＣＤ２、ＣＤ７、ＣＤ２５８、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤ８３に結合するリガンド、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ、及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメイン（一次シグナル伝達ドメイン）を含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含むキメラ融合タンパク質を含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原認識ドメインと、

膜貫通ドメインと、共刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメイン（共刺激シグナル伝達ドメイン）及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメイン（一次シグナル伝達ドメイン）を含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含むキメラ融合タンパク質を含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、１つ以上の共刺激分子に由来する２つの機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含むキメラ融合タンパク質を含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、１つ以上の共刺激分子に由来する少なくとも２つの機能的シグナル伝達ドメイン及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含むキメラ融合タンパク質を含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＡＲ融合タンパク質のアミノ末端（Ｎ－ｔｅｒ）に任意選択的なリーダー配列を含む。特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞外抗原結合ドメインのＮ末端にリーダー配列を更に含み、リーダー配列は、任意選択的に、細胞処理及びＣＡＲの細胞膜への局在化中に、ｓｃＦｖドメインから切断される。

【００９０】

本開示は、ＣＡＲをコードする核酸配列、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ構築物を提供し、ＣＡＲは、疾患関連抗原に結合する抗体断片を含む。特定の実施形態では、抗体断片をコードする配列は、細胞内ドメインをコードする核酸配列と連続しており、同じリーディングフレーム内にある。細胞内ドメインは、共刺激シグナル伝達領域及び／又はゼータ鎖を含む。共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子の細胞内ドメインを含むＣＡＲの一部分を指す。

【００９１】

特定の実施形態では、ＣＡＲ構築物は、任意選択的なリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、及び細胞内刺激ドメインを含む。特定の実施形態では、ＣＡＲ構築物は、任意選択的なリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び細胞内刺激ドメインを含む。

【００９２】

特定の実施形態では、発現カセットは、エフェクター増強遺伝子に加えて、キメラ抗原受容体の１つ以上の構成要素をコードするものを含む。例えば、一実施形態では、エフェクター増強遺伝子のコード配列と、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質のコード配列とを含む単一発現カセットが提供される。

【００９３】

特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ１９を標的とする。一実施形態では、ＣＡＲは、アキシカブタゲンシロルユーセルである。別の実施形態では、ＣＡＲは、ブレクスカブタゲンアウトルーセルである。別の実施形態では、ＣＡＲは、チサゲンレクルユーセルである。別の実施形態では、ＣＡＲは、リソカブタゲンマラルユーセルである。別の実施形態では、ＣＡＲは、イデカブタゲンビクルユーセルである。

【００９４】

一実施形態では、ＬＴＢＲ及びアキシカブタゲンシロルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＬＴＢＲ及びブレクスカブタゲンアウトルーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＬＴＢＲ及びチサゲンレクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＬＴＢＲ及びリソカブタゲンマラルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＬＴＢＲ及びイデカブタゲンビクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【００９５】

別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びアキシカブタゲンシロルユーセルのコード配列

を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＰＲＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びブレクスカブタゲンアウトルーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びチサゲンレクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びリソカブタゲンマラルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又は、ＡＤＡ及びイデカブタゲンビクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【００９６】

別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか及びアキシカブタゲンシロルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか及びブレクスカブタゲンアウトルーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか及びチサゲンレクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか及びリソカブタゲンマラルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか及びイデカブタゲンビクルユーセルのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【００９７】

特定の実施形態では、ＣＡＲは、メソテリンを標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＲＯＲ１を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、Ｂ７－Ｈ３を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ３３を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＥＧＦＲ８０６を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＩＬ１３Ｒα２を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＧＤ２を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＨＥＲ２を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、グリピカン３を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ７を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＮＹ－ＥＳＯ－１を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ３０を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＭＡＧＥ－Ａ１を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＬＭＰ２を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＰＤ１を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、変異体ＫＲＡＳ　Ｇ１２Ｖを標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ２０を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ２２を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ１７１を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ１２３を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ３８を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ１０を標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＢＡＦＦＲを標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＰＳＭＡを標的とする。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ムチン（ＴｎＭＵＣ１）を標的とする。Ｐｏｓｅｙ ＡＤ Ｊｒ，ｅｔ ａｌ，Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＣＡＲ Ｔ Ｃｅｌｌｓ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｃａｎｃｅｒ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｔｎ－Ｇｌｙｃｏｆｏｒｍ ｏｆ ｔｈｅ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｍｕｃｉｎ ＭＵＣ１ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ａｄｅｎｏｃａｒｃｉｎｏｍａ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０１６ Ｊｕｎ ２１；４４（６）：１４４４－５４．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｉｍｍｕｎｉ．２０１６．０５．０１４．ＰＭＩＤ：２７３３２７３３；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ５３５８６６７。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ７０を標的とする。Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ ｅｔ ａｌ，１９７２ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ ｏｆ ＡＬＬＯ－３１６：Ａ Ｆｒａｔｒｉｃｉｄｅ－Ｒｅｓｉｓｔａｎｔ Ａｌｌｏｇｅｎｅｉｃ ＣＡＲ Ｔ Ｔａｒｇｅｔｉｎ

ｇ ＣＤ７０ Ａｓ ａ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ＡＭＬ，６２ｎｄ ＡＳＨ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ ａｎｄ Ｅｘｐｏｓｉｔｉｏｎ，Ｄｅｃ．５－８，２０２０を参照されたい。特定の実施形態では、ＣＡＲは、ＴＲＩＢ１Ｃを標的とする。Ｍａｃｉｏｃｉａ ＰＭ，ｅｔ ａｌ，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ β－ｃｈａｉｎ ｃｏｎｓｔａｎｔ ｒｅｇｉｏｎ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｔ ｃｅｌｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ．Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０１７ Ｄｅｃ；２３（１２）：１４１６－１４２３．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍ．４４４４．Ｅｐｕｂ ２０１７ Ｎｏｖ １３．ＰＭＩＤ：２９１３１１５７。

【００９８】

様々な他のキメラ抗原受容体が当該技術分野で既知であるか、又は当業者によって設計され得る。かかるＣＡＲには、図１９に特定されるものなど、現在臨床的に試験されているものが含まれる。臨床試験情報は、提供されたＮＣＴ番号を使用してＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖに見出すことができる。代替の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか、及び図１９に特定されるＣＡＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、図１９に特定されるＬＴＢＲ及びＣＡＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【００９９】

他のキメラ抗原受容体には、自己免疫疾患の治療に有用なものが含まれ、キメラ自己抗原受容体（ＣＡＡＲ）などである。かかるＣＡＡＲには、ＤＳＧ３－ＣＡＡＲＴ及びＭｕＳＫ－ＣＡＡＲＴが含まれる。他が、当該技術分野で既知であり得るか、又は当業者によって設計され得る。代替の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか、及びＣＡＡＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＬＴＢＲ及びＣＡＡＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びＣＡＡＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【０１００】

本明細書に記載のＣＡＲ及びＴＣＲの例示的な配列が、以下の実施例２、３、及び４に提供される。ＣＡＲの構築に有用な他の例示的な抗体配列が、図２１に提供される。

【０１０１】

ある特定では、発現カセットは、表１の遺伝子、及び参照により本明細書に組み込まれる、Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ，ＷＯ２０１６／０７３４５６によって記載されるものなどの濾胞刺激ホルモン免疫受容体のコード配列を含む。

【０１０２】

特定の実施形態では、発現カセットは、エフェクター増強遺伝子に加えて、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む１つ以上の構成要素を含む。例えば、一実施形態では、エフェクター増強遺伝子のコード配列、及びＴＣＲアルファ及びベータ鎖を含む操作されたＴＣＲのコード配列を含む、単一発現カセットが提供される。一実施形態では、ＬＴＢＲ及びＴＣＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＡＴＦ６Ｂ、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ、ＣＡＬＭＬ３、ＩＬ１２Ｂ、ＩＦＮＬ２、又はＡＤＡ、及びＴＣＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか、及びＴＣＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【０１０３】

様々な他の操作されたＴ細胞受容体が、当該技術分野で既知であるか、又は当業者によって設計され得る。かかるＴＣＲには、図２０に特定されるものなど、現在臨床的に試験されているものが含まれる。代替の実施形態では、表１の遺伝子のうちのいずれか、及び図２０に特定されるＴＣＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。別の実施形

態では、図２０に特定されるＬＴＢＲ及びＴＣＲのコード配列を含む、発現カセットが提供される。

【０１０４】

本明細書に提供される核酸の特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子が、ＣＡＲ又はＴＣＲのための構成要素とともに発現カセットに提供される。他の実施形態では、エフェクター増強遺伝子が、ＣＡＲ又はＴＣＲの構成要素とは別の発現カセットに提供される。

【０１０５】

特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子及びＣＡＲ又はＴＣＲの発現と併せて、特定の他の遺伝子を下方調節又はサイレンシングすることが望ましい。かかる遺伝子には、例えば、ＴＮＦＡＩＰ３及びＮＦＫＢＩＡなどのＮＦκＢ経路の遺伝子が含まれる。遺伝子の下方調節又はサイレンシングのための組成物及び方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳなどが含まれる。特定の実施形態では、実施例１０に記載されるような、ＣＡＳタンパク質の送達と併せて、目的の遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡが提供される。

【０１０６】

他の実施形態では、エフェクター増強遺伝子をコードする核酸及びウイルスタンパク質をコードする核酸を含む組成物が提供される。望ましいウイルスタンパク質には、スパイクタンパク質、Ｅ２タンパク質、Ｅ１タンパク質、及びヘマグルチニン（ｈａｅｍａｇｌｕｔｉｎｉｎ）などの糖タンパク質が含まれる。一実施形態では、ウイルスタンパク質は、コロナウイルススパイクタンパク質である。サブタイプＨ１～Ｈ１６を含む少なくとも１６の異なるＨＡがある。Ｈ１、Ｈ２、及びＨ３は、ヒトインフルエンザウイルスに見出される。別の目的のＨＡは、トリインフルエンザウイルスＨ５Ｎ１に見出されるＨ５である。例えば、ウイルスタンパク質は、サブタイプＨ１～Ｈ１６の任意のＨＡを含み得る。他の好適なウイルス糖タンパク質には、デングウイルスエンベロープグリコポリペプチド、肝炎Ｃウイルスエンベロープグリコポリペプチドｅ１、Ｃ型肝炎ウイルスエンベロープグリコポリペプチドＥ２、ハンタウイルスエンベロープグリコポリペプチドＧ１、ハンタウイルスエンベロープグリコポリペプチドＧ２が含まれるが、これらに限定されない。ハンタウイルスエンベロープグリコポリペプチドＧ１及びＧ２は、任意選択的に、ハンタウイルスのアンデス、ハンタン、又はシンノンブル株からである。ウイルスグリコポリペプチドにはまた、ヒトサイトメガロウイルスグリコポリペプチドＢ、ヒトサイトメガロウイルスグリコポリペプチドＨ、ヒトヘルペスウイルス－８グリコポリペプチドＢ、ヒトヘルペスウイルス－８グリコポリペプチドＨ、ヒトメタニューモウイルスグリコポリペプチドＦ、ヒトメタニューモウイルスグリコポリペプチドＧ、ヒトパラインフルエンザウイルスフムグルチニン（ｈｕｍａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）－ニューラミニダーゼ、ヒトパラインフルエンザウイルス融合グリコポリペプチド、ニパウイルスグリコポリペプチドＦ、ニパウイルスグリコポリペプチドＧ、呼吸器合胞体ウイルスグリコポリペプチドＦ、呼吸器合胞体ウイルスグリコポリペプチドＧ、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルススパイクグリコポリペプチド、ウェストナルウイルスエンベロープグリコポリポリペプチド、及びＨＩＶ－１エンベロープグリコポリペプチドが含まれる。ＨＩＶ－１エンベロープグリコポリペプチドは、任意選択的に、ＨＩＶ－１　Ｂ株からのＹＵ２　Ｅｎｖ、ＳＦ１６２　Ｅｎｖ、Ｅｎｖ、ＨＩＶ－１　Ｃ株からのＥｎｖ、及びＨＩＶ－１　Ｍ株からのＥｎｖである。特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子及び／又はウイルスタンパク質のコード配列は、ｍＲＮＡとして提供される。

【０１０７】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」という用語は、１つ以上の生物学的に有用な核酸配列（例えば、タンパク質、酵素、又は他の有用な遺伝子産物、ｍＲＮＡなどをコードする遺伝子ｃＤＮＡ）と、それに操作可能に連結された、核酸配列（複数可）及びその遺伝子産物（複数可）の転写、翻訳、及び／又は発現を指示又は調節する調節配列と、をコードする核酸分子を指す。かかる調節配列は、典型的には、例えば、プロモーター

、エンハンサー、イントロン、コザック配列、ポリアデニル化配列、及びＴＡＴＡシグナルのうちの１つ以上を含む。発現カセットは、他のエレメントの中でも、遺伝子配列の上流（５’側）の制御性配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどのうちの１つ以上、及びエンハンサー、又は遺伝子配列の下流（３’側）の制御性配列、例えば、ポリアデニル化部位を含む３’非翻訳領域のうちの１つ以上を含有し得る。したがって、エフェクター増強遺伝子（及び／又はＣＡＲ若しくはＴＣＲ）のコード配列に加えて、発現カセットはまた、発現制御配列を含み得る。

【０１０８】

発現制御配列は、プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、そのなかでも、高い転写活性を有するプロモーターを利用することが望ましい。特定の強力な構成的プロモーターは、当該技術分野で既知であり、ＣＭＶプロモーター、ＥＦ－１αプロモーター、ＥＦＳプロモーター、ＣＢＧプロモーター、ＣＢ７プロモーター、ｈＰＧＫ、ＲＰＢＳＡ、ＷＡＳプロモーターなどを含むが、これらに限定されない。代替的に、調節可能な（誘導可能な）プロモーター［例えば、本明細書に参照により組み込まれる、ＷＯ２０１１／１２６８０８及びＷＯ２０１３／０４９４９３を参照されたい］、又は生理学的合図に応答するプロモーターなどの他のプロモーターが利用され得る。特定の実施形態では、ＬＴＢＲ（又は他のエフェクター増強遺伝子）が、Ｔ細胞がその標的細胞に遭遇し、抗原受容体（ＣＡＲ又はＴＣＲ）を介してシグナルを受信した後にのみ発現されるシステムを利用することが望ましく、標的細胞が取り除かれ、抗原受容体がもはやシグナルを伝達しなくなると、エフェクター増強遺伝子発現は減衰してバックグラウンドレベルまで戻る。したがって、特定の実施形態では、Ｔ細胞の活性化に応答するプロモーターを利用することが望ましい。かかるプロモーターには、ＮＦＡＴ、ＮＦκＢ、及びＡＰ１プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【０１０９】

発現カセットはまた、特定の実施形態では、同じ発現カセットからの複数のコード配列の発現を可能にする、１つ以上のＩＲＥＳ又は２Ａ配列を含み得る。本明細書に例示されるように、一実施形態では、ＣＤ１９に向けられるＣＡＲが、表１に特定される遺伝子のうちの１つ、例えば、ＬＴＢＲに向けられるＯＲＦとともに提供される。２Ａ配列を含むレンチウイルスベクターでは、図５Ａを参照されたい。例示的なＰ２Ａ配列が、配列番号５９に示される。かかるカセット及びベクターの構築は、当技術分野で既知であり、本明細書において実施例に記載されている。例えば、Ｓａｃｋ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｆｏｕｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｉｎ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｕｎｄｅｒｌｉｅｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｉｖｅｒｓ ａｎｄ Ａｎｅｕｐｌｏｉｄｙ Ｐａｔｔｅｒｎｓ．Ｃｅｌｌ．２０１８ Ａｐｒ ５；１７３（２）：４９９－５１４．ｅ２、及びＹａｎｇ ｅｔ ａｌ，Ａ ｐｕｂｌｉｃ ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ ｈｕｍａｎ ＯＲＦｓ，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１１ Ａｕｇ；８（８）：６５９－６６１を参照されたく、それらは参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１０】

構築物の様々な構成要素のコード配列の配置は、変更することができる。例えば、特定の態様では、ＣＡＲコード配列の上流にエフェクター増強遺伝子コード配列を配置することが望ましい。他の実施形態では、ＣＡＲコード配列の下流にエフェクター増強遺伝子コード配列を配置することが望ましい。他の実施形態では、選択マーカー遺伝子が、構築物に含まれる。

【０１１１】

特定の態様では、本明細書に記載される核酸及び／又は発現カセットを含む改変リンパ球を含む組成物が、本明細書において提供される。一実施形態では、宿主リンパ球は、Ｔ細胞である。別の実施形態では、宿主リンパ球は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である。特定の実施形態では、組成物は、リンパ球の混合集団（例えば、アルファベータＴ細胞及びＮＫ　Ｔ細胞）を含む細胞集団を含む。他の実施形態では、組成物は、特定のリンパ

球集団について濃縮された集団を含む細胞を含む。

【０１１２】

本明細書に使用される場合、「Ｔ細胞」という語句は、Ｔ細胞受容体分子を発現するリンパ球を指す。Ｔ細胞には、ヒトアルファベータ（αβ）Ｔ細胞及びヒトガンマデルタ（γδ）Ｔ細胞が含まれる。Ｔ細胞としては、ナイーブＴ細胞、刺激Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、培養Ｔ細胞、不死化Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、調節性Ｔ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、それらの組み合わせ、又はそれらの亜集団が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ細胞は、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、又はＣＤ４＋及びＣＤ８＋であることができる。Ｔ細胞はまた、ＣＤ４－、ＣＤ８－、又はＣＤ４－及びＣＤ８－であることができる。Ｔ細胞は、ヘルパー細胞、例えば、T_H1、T_H2、T_H3、T_H9、T_H17、又はT_{FH}型のヘルパー細胞であることができる。Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞であることができる。Ｔ細胞はまた、調節性Ｔ細胞であることができる。調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、ＦＯＸＰ３＋又はＦＯＸＰ３－であることができる。Ｔ細胞は、アルファ／ベータＴ細胞又はガンマ／デルタＴ細胞であることができる。場合によっては、Ｔ細胞は、$CD4+CD25^{hi}CD127^{lo}$調節性Ｔ細胞である。場合によっては、Ｔ細胞は、１型調節性（Ｔｒ１）、T_H3、ＣＤ８＋ＣＤ２８－、Ｔｒｅｇ１７、及びＱａ－１制限Ｔ細胞、又はそれらの組み合わせ若しくはサブ集団からなる群から選択される調節性Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$FOXP3^{+}$Ｔ細胞である。場合によっては、Ｔ細胞は、$CD4^{+}CD25^{lo}CD127^{hi}$エフェクターＴ細胞である。場合によっては、Ｔ細胞は、$CD4^{+}CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}$ＣＤ４５ＲＯ－ナイーブＴ細胞である。特定の実施形態では、Ｔ細胞は、Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ウイルス抗原を発現する。他の実施形態では、Ｔ細胞は、がん抗原を発現する。Ｔ細胞は、遺伝子操作されている組換えＴ細胞であることができる。

【０１１３】

本明細書に使用される場合、初代細胞の文脈における「初代」という語句は、形質転換されていないか、又は不死化されていない細胞である。かかる初代細胞は、限定した回数で培養、サブ培養、又は継代する（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０回培養する）ことができる。場合によっては、初代細胞は、インビトロ培養条件に適合される。場合によっては、初代細胞は、生物、系、器官、又は組織から単離され、任意選択的に、選別され、培養又はサブ培養することなく直接利用される。場合によっては、初代細胞は刺激されるか、活性化されるか、又は分化される。例えば、初代Ｔ細胞は、ＣＤ３、ＣＤ２８アゴニスト、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、又はそれらの組み合わせとの接触（例えば、それらの存在下での培養）によって活性化することができる。

【０１１４】

方法

改変宿主細胞を作製する方法

また、本明細書に記載される改変細胞を作製する方法及び改変細胞を含有する組成物が、本明細書において提供される。細胞、例えば、リンパ球を改変して、エフェクター増強遺伝子、ＣＡＲ、若しくはＴＣＲのコード配列、又はこれらの配列のうちの２つ以上を含む発現カセット又は発現ベクターなどの外因性配列を導入する方法は、当該技術分野で既知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１６／１０９４１０Ａ２を参照されたい。特定の実施形態では、２つ以上の外因性配列が導入される。

【０１１５】

本明細書で使用される「改変された」という用語によって、本発明の分子又は細胞の変化した状態又は構造が意味される。分子は、化学的、構造的、及び機能的を含む多くの方法で改変され得る。細胞は、核酸の導入によって改変され得る。改変することは、例えば、遺伝子をコードする外因性核酸を導入することによって、リンパ球における遺伝子の発現を変化させることを指すことができる。

【０１１６】
本明細書に提供されるリンパ球は、本明細書に記載されるように、例えば、遺伝子をコードする核酸配列を発現するように、トランスフェクション、形質導入、又はエレクトロポレーションによって遺伝子改変することができる。臨床状況に応じて、例えば、患者の状態若しくは治療されるべき状態、遺伝子の長期的若しくは恒久的な発現、及び／又は、例えば、堅牢で長期継続するＣＡＲ活性、例えば、抗腫瘍活性が望ましくあり得る。かかる実施形態では、リンパ球は、所望のエフェクター機能を付与するために、本明細書に開示される遺伝子をコードする核酸配列を含むベクターを使用して、遺伝子改変、例えば、形質導入、例えば、ウイルスによって形質導入される。他の実施形態では、遺伝子の一過性発現が望ましい。かかる実施形態では、エフェクター増強遺伝子を発現する、例えば、ｍＲＮＡ又は調節可能なプロモーターの使用が、使用され得る。
【０１１７】
遺伝子を細胞内に導入及び発現する方法は、当該技術分野で既知である。発現ベクターの文脈において、ベクターは、当該技術分野における任意の既知によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母、又は昆虫細胞内に容易に導入され得る。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、又は生物学的手段によって宿主細胞内に移入することができる。
【０１１８】
ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝突、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２０１２，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，ｖｏｌｕｍｅｓ １－４，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ）を参照されたい。ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入する好適な方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。
【０１１９】
目的のポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための生物学的方法には、ＤＮＡ及びＲＮＡベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、及び特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞内に遺伝子を挿入するために最も広範に使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。
【０１２０】
ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、並びに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む、脂質ベースの系が含まれる。インビトロ及びインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。標的化ナノ粒子又は他の好適なサブミクロンサイズの送達系によるポリヌクレオチドの送達などの、核酸の標的化送達の他の方法が利用可能である。脂質製剤の使用は、（インビトロ、エクスビボ、又はインビボで）宿主細胞への核酸の導入のために企図される。別の態様では、核酸は、脂質と会合し得る。脂質と会合する核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化され得るか、リポソームの脂質二重層内に散在され得るか、リポソーム及びポリヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリポソームに取り付けられ得るか、リポソーム内に捕捉され得るか、リポソームと複合体化され得るか、脂質を含有する溶液中に分散され得るか、脂質と混合され得るか、脂質と組み合わされ得るか、脂質中に懸濁液として含有され得るか、ミセルを含有し得るか若しくはミセルと複合体化され得るか、又は他の方法で脂質と会合され得る。脂質、脂質／ＤＮＡ又は脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液中の任意の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造、ミセルとして、又は「崩壊した」構造で存在してもよい。それらはまた、単に溶液中に散在してもよく、場合によっては、サイズ又は形状が均一ではな

い凝集体を形成してもよい。脂質は、天然に存在する脂質又は合成脂質であり得る脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質内に天然に存在する脂肪小滴、並びに長鎖脂肪族炭化水素及びその誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドを含有する化合物のクラスが含まれる。リポフェクタミン－核酸複合体も企図される。

【０１２１】

宿主細胞内に外因性核酸を導入するために使用される方法に関わらず、又はそうでなければ本発明の抑制因子に細胞を曝露するために使用される方法に関わらず、宿主細胞内の組換え核酸配列の存在を確認するために、様々なアッセイを行うことができる。かかるアッセイには、例えば、サザンブロッティング及びノーザンブロッティング、ＲＴ－ＰＣＲ及びＰＣＲ、例えば、免疫学的手段（ＥＬＩＳＡ及びウェスタンブロット）によって特定のペプチドの存在又は不存在を検出するなどの生化学的アッセイが含まれる。

【０１２２】

特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子のコード配列を含む発現ベクターが提供される。他の実施形態では、発現ベクターは、ＣＡＲ又はＴＣＲの１つ以上の構成要素のコード配列を含む。他の実施形態では、ＣＡＲ又はＴＣＲの１つ以上の構成要素のコード配列を含む別個の発現ベクターが提供される。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを取り込む、コスミド、プラスミド（例えば、ネイキッドであるか又はリポソームに含有される）、及びウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）を含む、当該技術分野で既知の全てのものが含まれる。一実施形態では、発現ベクターは、レンチウイルスである。２つ以上の発現ベクターが利用される場合、各発現ベクターは、当該技術分野で既知のものの中から個別に選択され得る。

【０１２３】

本明細書に記載されるエフェクター増強遺伝子を発現するように、任意選択的に、ＣＡＲ又はＴＣＲを発現するように改変される免疫エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞）の集団を作製する方法が、本明細書において提供される。かかる免疫細胞を作製するための方法は、表１のものから選択される遺伝子をコードする外因性核酸を細胞に導入することを含む。以下に記載される実施例では、便宜上、改変Ｔ細胞を作製する方法が記載される。しかしながら、代替の実施形態は、他の種類の免疫細胞、例えば、ＮＫ　Ｔ細胞又はＮＫ細胞を使用することが想定される。好適な方法は、当該技術分野で既知である。

【０１２４】

簡単に説明すると、例示的な方法は、免疫エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞）の集団を提供することと、任意選択的に、集団からＴ調節性細胞、例えば、ＣＤ２５＋Ｔ細胞を除去することと、を含む。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞の集団は、細胞が治療のために投与される対象に対して自己である。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞の集団は、自己Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞を含む。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞の集団は、細胞が治療のために投与される対象に対して同種異系である。一実施形態では、Ｔ調節性細胞、例えば、ＣＤ２５＋Ｔ細胞は、抗ＣＤ２５抗体、若しくはその断片、又はＣＤ２５結合リガンド、例えば、ＩＬ－２を使用して、集団から除去される。一実施形態では、抗ＣＤ２５抗体若しくはその断片、又はＣＤ２５結合リガンドは、基質、例えば、ビーズにコンジュゲートされるか、さもなければ、基質、例えば、ビーズにコーティングされる。一実施形態では、抗ＣＤ２５抗体又はその断片は、本明細書に記載される基質にコンジュゲートされる。一実施形態では、Ｔ調節性細胞、例えば、ＣＤ２５＋Ｔ細胞は、抗ＣＤ２５抗体分子、又はその断片を使用して集団から除去される。別の実施形態では、ＣＤ２５＋細胞は除去されない。

【０１２５】

別の例示的な方法は、免疫エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞）の集団を提供することと、ＣＤ８＋細胞及び／又はＣＤ４＋細胞について集団を濃縮することと、を含む。一実施形態では、集団は、抗ＣＤ８及び／若しくは抗ＣＤ４抗体、又はそれらの断片、あるい

はＣＤ８結合リガンド及び／又はＣＤ４結合リガンドを使用して、ＣＤ８＋及び／又はＣＤ４＋Ｔ細胞について濃縮される。一実施形態では、抗ＣＤ４及び／若しくは抗ＣＤ８抗体又はそれらの断片、あるいは抗ＣＤ４及び／又は抗ＣＤ８結合リガンドは、基質、例えばビーズにコンジュゲートされるか、さもなければ基質、例えばビーズにコーティングされる。

【０１２６】

特定の実施形態では、方法は、細胞に、表１のものから選択される遺伝子、例えば、ＬＴＢＲ、及び任意選択的に、ＣＡＲ又はＴＣＲをコードする核酸を含む１つ以上のベクターを送達することを更に含む。特定の実施形態では、ベクターは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターから選択される。特定の実施形態では、Ｔ細胞集団からの細胞は、免疫エフェクター細胞の集団が、対象からの血液試料から得られた、例えば、アフェレーシスによって得られた後、例えば、１日以内に、ベクターによって１回形質導入される。特定の実施形態では、方法は、Ｔ細胞の集団から外因性ＲＮＡを一過性に発現するＲＮＡ操作した細胞の集団を生成することを更に含む。方法は、インビトロ転写したＲＮＡ又は合成ＲＮＡを集団からの細胞に導入することを含み、ＲＮＡは表１の遺伝子、例えば、ＬＴＢＲをコードする核酸を含む。例えば、特定の実施形態では、Ｔ細胞の集団は、ＣＡＲをコードする核酸を含むベクターで形質導入され得、次いで、同じ細胞集団は、表１の遺伝子、例えば、ＬＴＢＲをコードするｍＲＮＡが導入され得る。

【０１２７】

一実施形態では、本明細書に記載の改変細胞は、拡張される。一実施形態では、細胞は、培養で数時間（例えば、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、１８、２１時間）～約１４日間（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、又は１４日）の期間拡張される。一実施形態では、細胞は、培養で３又は４日間拡張され、もたらされる細胞は、同じ培養条件下で、９日間培養で拡張された同じ細胞よりも効力がある。効力は、例えば、様々なＴ細胞機能、例えば、増殖、標的細胞殺滅、サイトカイン産生、活性化、移動、又はそれらの組み合わせによって定義することができる。

【０１２８】

治療方法

また、特定の態様では、対象におけるがんを打ち負かす方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、方法は、対象に、本明細書に記載されるエフェクター増強遺伝子を発現する細胞を投与することを含み、それによってがんが対象において打ち負かされる。特定の実施形態では、細胞は、ＣＡＲを更に発現する。他の実施形態では、細胞は、ＴＣＲを更に発現する。打ち負かす方法を説明する際に本明細書で使用される場合、ＬＴＢＲは、便宜上、例示的なエフェクター増強遺伝子として利用される。しかしながら、代替の実施形態では、表１の他の遺伝子が利用される。特定の実施形態では、方法は、患者から細胞を得ることと、本明細書に記載される細胞を改変することと、細胞を患者に投与することと、を含む。

【０１２９】

エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）によって治療可能であるがんの例は、血液がんである。特定の実施形態では、血液がんには、白血病（急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、及び骨髄異形成症候群など）、及びリンパ腫（多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、並びに小細胞及び大細胞濾胞性リンパ腫など）を含む悪性リンパ増殖性状態が含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、血液がんは、例えば、白血病、例えば、ＡＭＬ又はＭＤＳの微小残存病変、ＭＲＤを含むことができる。特定の実施形態では、がんは、固形腫瘍である。特定の実施形態では、がんは、膵臓がん、黒色腫、多発性骨髄腫、肉腫、又は肺がんである。別の実施形態では、がんは、濾胞刺激ホルモンに関連するがんである。かかるがんには、乳がん、肺がん、前立腺

がん、結腸直腸がん、食道がん、胃がん、膀胱がん、膵臓がん、腎臓がん、子宮頸がん、肝臓がん、卵巣がん、及び精巣がんが含まれる。別の実施形態では、がんは、図１９又は図２０におけるリストに含まれるがんである。

【０１３０】

特定の実施形態では、ＣＡＲは、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（Ａｂｅｃｍａ（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標））、チサゲンレクルユーセル（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））から選択される。

【０１３１】

別の実施形態では、対象は、ウイルス駆動がんを有する。特定の実施形態では、ウイルス駆動がんは、以下から選択される：

【表３】

表３

ウイルス	条件
エプスタイン-バーウイルス(EBV)	バーキットリンパ腫
Ｂ型肝炎ウイルス(HBV)	肝臓がん
Ｃ型肝炎ウイルス(HCV)	肝臓がん
ヒトヘルペスウイルス 8(HH8)	カポジ肉腫
ヒトパピローマウイルス(HPV)	子宮頸がん、頭頸部がん、肛門がん、口腔がん、咽頭がん、及び陰茎がん
ヒトＴ細胞リンパ球向性ウイルス 1(HTLV)	成人Ｔ細胞白血病
メルケル細胞ポリオーマウイルス	皮膚がん(メルケル細胞がん)

【０１３２】

別の態様では、対象における自己免疫疾患を治療する方法が提供される。自己免疫疾患は、身体に対する異常な免疫攻撃から生じる状態であり、それらは、罹患率、死亡率、及び世界的に医療コストを実質的に増加させる。Ｔ細胞が自己免疫疾患のプロセスにおいて重要な役割を演じるにつれて、操作されたＴ細胞療法が出現し、また、自己免疫疾患の治療における現在の障害を克服するための潜在的なアプローチとしてみなされている。自己反応性又は自己抗体のいずれかが、自己免疫疾患のプロセスにおいて主要な役割を演じる。したがって、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）を発現するようにＴ細胞を操作することは、自己免疫疾患の治療のための戦略である。一実施形態では、ＣＡＲは、ＣＡＡＲを含む。例えば、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ，Ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｔ－ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｂｅｙｏｎｄ ｃａｎｃｅｒ：ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒａｃｔｉｃｅ ａｎｄ ｆｕｔｕｒｅ ｐｒｏｓｐｅｃｔｓ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０２０ Ｓｅｐ；１２（１３）：１０２１－１０３４．ｄｏｉ：１０．２２１７／ｉｍｔ－２０２０－０００９．Ｅｐｕｂ ２０２０ Ｊｕｌ ３０を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。自己免疫疾患には、尋常性天疱瘡（ＰＶ）（例えば、ＤＳＧ３－ＣＡＡＲ－Ｔ）及び狼瘡（例えば、ＭｕＳＫ－ＣＡＡＲ－Ｔ）が含まれる。他の自己免疫疾患には、１型糖尿病、自己免疫甲状腺疾患、関節リウマチ（ＲＡ）、炎症性腸疾患、大腸炎、全身性エリテマトーデス、及び多発性硬化症（ＭＳ）が含まれる。例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ Ｄｅｒｉｖｉｎｇ ｆｒｏｍ ＣＡＲ－Ｔ Ｃｅｌｌ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｉｎ Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｖｏｌｕｍｅ ２０１９，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ３１，２０１９を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３３】

一態様では、方法は、それを必要とする対象に、有効量の本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）を、有効量の別の療法と併用して投与することを含む。本明細書で使用される場合、「併用して」投与されることは、障害を伴う対象の苦痛の経過中に２つ（又はそれ以上）の異なる治療が対象に送達されることを意味し、例えば、２つ以上の治療は、対象が障害を有していると診断された後、及び障害が治癒若しくは排除されるか、又は他の理由により治療が中止される前に送達される。いくつかの実施形態では、１つの治療の送達は、第２の送達が始まるときに既に発生しており、そのため投与の点から重複がある。これは、本明細書で「同時」又は「同時発生送達」と称されることがある。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の送達が始まる前に終了する。いずれかの場合のいくつかの実施形態では、治療は、併用投与のためにより効果的である。例えば、第２の治療は、第２の治療が第１の治療の不存在下で投与された場合に認められるか、又は類似の状況が第１の治療で認められるよりも、より効果的であり、例えば、同等の効果が、より少ない第２の治療で認められるか、又は第２の治療は、より大きな程度まで症状を低減する。いくつかの実施形態では、送達は、障害に関連する症状又は他のパラメータの低減が、一方の治療が他方の治療の不存在下で送達されて観察されるものよりも大きくなるものである。２つの治療の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、又は相加的よりも大きいことができる。送達は、第２の治療が送達されるときに、送達された第１の治療の効果が依然として検出可能であるようにすることができる。

【０１３４】

本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）及び少なくとも１つの追加の治療剤は、同時に、同じ又は別個の組成物で、又は連続して投与することができる。連続投与では、本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）を最初に投与することができ、追加の薬剤を２番目に投与することができるか、又は投与の順序を逆にすることができる。

【０１３５】

エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）及び／又は他の治療剤、処置、若しくはモダリティは、活性障害の期間中、又は寛解若しくはより低い活性疾患の期間中に投与することができる。エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）は、他の治療前に、治療と同時に、治療後に、又は障害の寛解中に投与することができる。

【０１３６】

併用して投与される場合、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）及び追加の薬剤（例えば、第２又は第３の薬剤）、又は全ては、例えば、単剤療法として個別に使用される各薬剤の量又は投与量よりも高いか、低いか、又は同じ量若しくは用量で投与することができる。特定の実施形態では、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）、追加の薬剤（例えば、第２又は第３の薬剤）、又は全ての投与される量若しくは投与量は、個々に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量又は投与量よりも低い（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、又は少なくとも５０％）。他の実施形態では、所望の効果（例えば、がんの治療）をもたらすエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）、追加の薬剤（例えば、第２又は第３の薬剤）、又は全ての量又は投与量は、同じ治療効果を達成するために必要とされる、例えば、単剤療法として、個別に使用される各薬剤の量又は投与量よりも低い（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、又は少なくとも５０％低い）。

【０１３７】

更なる態様では、本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）は、手術、化学療法、放射線、免疫抑制剤

、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキセート、ミコフェノール酸塩、及びＦＫ５０６、抗体、あるいは他の免疫除去剤、例えばＣＡＭＰＡＴＨ、抗ＣＤ３抗体、若しくは他の抗体療法、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、ＦＲ９０１２２８、サイトカイン、放射線、又はＩｚｕｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．２００８ Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ １０８：９６３－９７１に記載されるようなペプチドワクチンなどと併用して治療レジメンに使用され得る。

【０１３８】

特定の場合において、本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ ＴＣＲ－Ｔ細胞）は、他の抗がん剤、抗アレルギー剤、制吐剤（又は鎮吐剤）、鎮痛剤、細胞保護剤、及びそれらの組み合わせなどの他の治療剤と併用される。

【０１３９】

特定の実施形態では、本明細書におけるエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ ＴＣＲ－Ｔ細胞）は、化学療法剤と併用して用いることができる。例示的な化学療法剤としては、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン（例えば、リポソームドキソルビシン））、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、デカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド）、免疫細胞抗体（例えば、アレムツザマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、ブレンツキシマブ）、抗代謝物質（例えば、葉酸拮抗剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビンを含む））、ｍＴＯＲ阻害剤、ＴＮＦＲグルコルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連タンパク質（ＧＩＴＲ）アゴニスト、プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンＡ、グリオトキシン、又はボルテゾミブ）、サリドミド若しくはサリドミド誘導体（例えば、レナリドミド）などの免疫調節剤、又は免疫チェックポイント阻害剤（例えば、ＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１阻害剤、例えば、ペンブロリズマブ（キイトルーダ）、ニボルマブ（オプジーボ）、セミプリマブ（リブタヨ）、アテゾリズマブ（テセントリク）、アベルマブ（バベンシオ）、デュルバルマブ（イミフィンジ））が挙げられる。

【０１４０】

併用療法における使用のために考慮される一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール（Ａｒｉｍｉｄｅｘ（登録商標））、ビカルタミド（Ｃａｓｏｄｅｘ（登録商標））、硫酸ブレオマイシン（Ｂｌｅｎｏｘａｎｅ（登録商標））、ブスルファン（Ｍｙｌｅｒａｎ（登録商標））、ブスルファン注射剤（Ｂｕｓｕｌｆｅｘ（登録商標））、カペシタビン（Ｘｅｌｏｄａ（登録商標））、Ｎ４－ペントキシカルボニル－５－デオキシ－５－フルオロシチジン、カルボプラチン（パラプラチン（登録商標））、カルムスチン（ＢｉＣＮＵ（登録商標））、クロラムブシル（Ｌｅｕｋｅｒａｎ（登録商標））、シスプラチン（Ｐｌａｔｉｎｏｌ（登録商標））、クラドリビン（Ｌｅｕｓｔａｔｉｎ（登録商標））、シクロホスファミド（Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）又はＮｅｏｓａｒ（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（Ｃｙｔｏｓａｒ－Ｕ（登録商標））、シタラビンリポソーム注射剤（ＤｅｐｏＣｙｔ（登録商標））、ダカルバジン（ＤＴＩＣ－Ｄｏｍｅ（登録商標））、ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ、コスメガン）、塩酸ダウノルビシン（Ｃｅｒｕｂｉｄｉｎｅ（登録商標））、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射剤（ＤａｕｎｏＸｏｍｅ（登録商標））、デキサメタゾン、ドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ（登録商標））、塩酸ドキソルビシン（Ａｄｒｉａｍｙｃｉｎ（登録商標）、Ｒｕｂｅｘ（登録商標））、エトポシド（Ｖｅｐｅｓｉｄ（登録商標））、リン酸フルダラビン（Ｆｌｕｄａｒａ（登録商標））、５－フルオロウラシル（Ａｄｒｕｃｉｌ（登録商標）、Ｅｆｕｄｅｘ（登録商標））、フルタミド（Ｅｕｌｅｘｉｎ（登録商標））、テザシチビン、ゲムシタビン（ジフルオロデオキシシチジン）、ヒドロキシ尿素（Ｈｙｄｒｅａ（登録商標））、イダルビシン（Ｉｄａｍｙｃｉｎ（登録商標））、イホスファミド（ＩＦ

ＥＸ（登録商標））、イリノテカン（Ｃａｍｐｔｏｓａｒ（登録商標））、Ｌ－アスパラギナーゼ（ＥＬＳＰＡＲ（登録商標））、ロイコボリンカルシウム、メルファラン（Ａｌｋｅｒａｎ（登録商標））、６－メルカプトプリン（Ｐｕｒｉｎｅｔｈｏｌ（登録商標））、メトトレキセート（Ｆｏｌｅｘ（登録商標））、ミトキサントロン（Ｎｏｖａｎｔｒｏｎｅ（登録商標））、ミロターグ、パクリタキセル（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、フェニックス（イットリウム９０／ＭＸ－ＤＴＰＡ）、ペントスタチン、カルムスチンを有するポリフェプロサン２０インプラント（Ｇｌｉａｄｅｌ（登録商標））、クエン酸タモキシフェン（Ｎｏｌｖａｄｅｘ（登録商標））、テニポシド（Ｖｕｍｏｎ（登録商標））、６－チオグアニン、チオテパ、チラパザミン（Ｔｉｒａｚｏｎｅ（登録商標））、注射用トポテカン塩酸塩（Ｈｙｃａｍｐｔｉｎ（登録商標））、ビンブラスチン（Ｖｅｌｂａｎ（登録商標））、ビンクリスチン（Ｏｎｃｏｖｉｎ（登録商標））、及びビノレルビン（Ｎａｖｅｌｂｉｎｅ（登録商標））が挙げられる。

【０１４１】

化学療法剤と本明細書に記載のエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）との併用による治療を使用して、本明細書に記載の血液がん、例えば、ＡＭＬを治療することができる。実施形態では、化学療法剤とエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）との併用は、例えば、ＡＭＬを有する対象において、がん幹細胞、例えば、白血病幹細胞を標的化する、例えば、殺滅するのに有用である。実施形態では、化学療法剤とエフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）との併用は、微小残存病変（ＭＲＤ）を治療するのに有用である。ＭＲＤは、治療中、例えば、化学療法中、又は治療後に対象に残る少数のがん細胞を指す。ＭＲＤは、しばしば再発の主な原因である。本発明は、例えば、本明細書に記載されるように、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）と併用して化学療法剤を投与することを含む、がん、例えば、ＭＲＤを治療するための方法を提供する。

【０１４２】

特定の実施形態では、化学療法剤は、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）の投与前に投与される。化学療法剤の２回以上の投与が望まれる化学療法レジメンでは、化学療法レジメンは、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）の投与前に開始されるか又は完了される。実施形態では、化学療法剤は、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）の投与の少なくとも１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、２０日、２５日、又は３０日前に投与される。実施形態では、化学療法レジメンは、エフェクター増強遺伝子発現細胞（例えば、ＬＴＢＲ　ＣＡＲＴ又はＬＴＢＲ　ＴＣＲ－Ｔ細胞）の投与の少なくとも１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、２０日、２５日、又は３０日前に開始されるか又は完了される。

【０１４３】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、又は「有効量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染又は転移の程度、及び状態の個体差を考慮して医師によって決定され得る。本明細書に記載のＴ細胞を含む医薬組成物は、細胞10^4～10^9個／ｋｇ体重、場合によっては、細胞10^5～10^6個／ｋｇ体重、それらの範囲内の全ての整数値を含む、投与量で、投与され得ることを一般的に言明することができる。Ｔ細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫療法において一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｗ　Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ　Ｍｅｄ．３１９：１６７６，１９８８を参照）。本明細書で使用される場合、薬剤の「有効量」という用語は、有益な又は所望の結果、

例えば、臨床結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に依存する。例えば、腫瘍を治療する薬剤を投与する状況において、有効量の薬剤は、例えば、薬剤を投与せずに得られた応答と比較して、腫瘍のサイズを低下若しくは減少させるか、又は腫瘍の成長を阻害するのに十分な量である。「有効量」という用語は、「有効用量」、「治療有効量」、又は「治療有効用量」と互換的に使用することができる。

【０１４４】

また、少なくとも１つのエフェクター増強遺伝子及び少なくとも１つのウイルスタンパク質をコードする少なくとも２つの核酸配列を含む併用ワクチンで対象をワクチン接種する方法が、本明細書において提供される。一実施形態では、エフェクター増強遺伝子は、ＬＴＢＲである。別の実施形態では、ウイルスタンパク質は、コロナウイルススパイクタンパク質である。いくつかの実施形態は、カチオン性脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に製剤化された、エフェクター増強遺伝子をコードするオープンリーディングフレームを有するＲＮＡポリヌクレオチドと、エフェクター増強遺伝子をコードするオープンリーディングフレームを有するＲＮＡポリヌクレオチドと、ウイルスタンパク質と、薬学的に許容される担体又は賦形剤と、を含むワクチンを提供する。本明細書に記載のワクチン（例えば、ＬＮＰカプセル化ｍＲＮＡワクチン）は、接種を受けた対象の血液又は血清中に、予防的及び／又は治療的に有効なレベル、濃度、及び／又は力価の抗原特異的抗体を産生する。例えば、ＵＳ２０１８／０３１１３３６Ａ１を参照にされたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４５】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語及び「治療する」又は「治療すること」などのその変形は、治療される個体の自然経過を変更しようとする試みにおける臨床介入を指し、予防のために、又は臨床病理学の経過中のいずれかで行うことができる。治療の望ましい効果としては、疾患の発生又は再発を予防又は低減すること、症状の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の軽減、疾患進行の速度を低減すること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は改善した予後が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、疾患の発症を遅延させるために、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【０１４６】

同様に、本明細書で使用される場合、「がんの治療」又は「がんを治療すること」という用語は、いくつかの異なるパラメータによって記載することができ、がんを有する動物における腫瘍のサイズにおける低減、がんを有する動物における腫瘍の成長若しくは増殖の低減、転移を防止すること若しくは転移の程度を低減すること、及び／又は対照と比較してがんを有する動物の生存を延長することを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、治療は、遠位再発又は転移の低減したリスクをもたらす。

【０１４７】

本明細書で使用される「がん」という用語は、調節されない細胞増殖又は複製を特徴とする任意の疾患、状態、形質、遺伝子型、又は表現型を指す。特定の実施形態では、本明細書に開示の組成物の投与は、例えば、本明細書に開示の方法に従って、がんを治療する。特定の実施形態では、がんは、副腎皮質がん、進行性がん、肛門がん、再生不良性貧血、胆管がん、膀胱がん、骨がん、骨転移、脳腫瘍、脳がん、乳がん、小児がん、原因不明のがん、キャッスルマン病、子宮頸がん、結腸／直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ユーイング腫瘍、眼がん、胆嚢がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カポジ肉腫、腎細胞がん、喉頭及び下咽頭がん、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、肝臓がん、肝細胞がん（ＨＣＣ）、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、肺カルチノイド腫瘍、皮膚のリンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔及び副鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔及び中咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、下垂体腫瘍、前立腺がん、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液

腺がん、成人軟組織における肉腫、基底及び扁平細胞がん、黒色腫、小腸がん、胃がん、精巣がん、咽頭がん、胸腺がん、甲状腺がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンストロームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、がん治療によって引き起こされた二次がん、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、がんは、図１９又は図２０に列挙されるもののうちの１つである。

【０１４８】

スクリーニング方法

リンパ球活性を変化させる遺伝子を特定するために機能獲得スクリーニングを行う方法が、本明細書において開示される。遺伝子には、例えば、リンパ球によって典型的には発現され得ないもの、又は特定のリンパ球集団若しくは状況（例えば、抗原への曝露後）においてのみ発現される遺伝子が含まれる。発現が刺激によって変更されるか、又は典型的には発現されない遺伝子を特定する能力は、ＲＮＡ配列決定に基づくものを含む、調整された偏ったライブラリに依存する方法の特定の利点を有する。特に、開示される方法は、多くの異なる生理学的及び病理学的状況への機能獲得試験の移行を容易にし、操作が困難な細胞型を修正する。

【０１４９】

特定の実施形態では、改変リンパ球において外因性に発現されるとき、改変リンパ球の治療機能を変化させる遺伝子を特定する方法が提供され、方法は、（ａ）リンパ球集団を得ることと、（ｂ）各ウイルスベクターがバーコードに連結された遺伝子をコードする、複数のウイルスベクターでリンパ球集団を形質導入することと、（ｃ）形質導入したリンパ球を刺激して、活性化、増殖、及び／又はエフェクター機能を誘導することと、（ｄ）（ｃ）のリンパ球集団から形質導入したリンパ球を単離することと、（ｅ）単離されたリンパ球における遺伝子及び／又は連結されたバーコードの存在を検出することと、を含む。方法に従って特定した遺伝子は、遺伝子を発現する改変リンパ球の治療機能を変化させるのに有効である。遺伝子を発現するリンパ球及びリンパ球を対象に送達するための方法が、本明細書において提供される。

【０１５０】

本明細書に例示されるスクリーニング方法は、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）ライブラリのレンチウイルス媒介性送達を利用する（Ｓａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１８　Ａｐｒ　５；１７３（２）：４９９－５１４．ｅ２を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる）が、方法は、非コードＲＮＡ（例えば、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）及び長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ、長ｎｃＲＮＡ））などの非コード配列、並びに代替ＯＲＦ、マイクロＯＲＦ、上流ＯＲＦなど（すなわち、ゲノムにおける小タンパク質コードエレメント）の発現をスクリーニングするアプローチに及ぶ。したがって、本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、タンパク質及びそうでないものの両方をコードする配列を指す。

【０１５１】

本明細書で使用される「バーコード」又は「バーコード配列」という用語は、発現遺伝子の検出及び／又は特定に対応し、それを可能にするヌクレオチド配列を指す。バーコードは、典型的には、４個以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、４、５、６、７、８、９、１０、１１、２、１３、１４、又は１５個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、８～１５個のヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「バーコード化遺伝子」、「バーコード化ＯＲＦ」などの用語は、バーコードがＯＲＦの５’末端又は３’末端に直接連結されているか、又はＯＲＦの５’末端又は３’末端で１個以上のヌクレオチドによって分離されているいずれかで、付加されたバーコード化配列を有する核酸を指す。

【０１５２】

特定の態様は、Ｔ細胞に関して本明細書に記載されているが、開示されている方法は、ＮＫ　Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｂ細胞、γδＴ細胞、並びにそれらの組み合わせ及び亜集団を含むが、これらに限定されない、他のリンパ球集団における変化した機能的応答を特定す

ることができる。特定の実施形態では、リンパ球集団は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｖγ９Ｖδ２　Ｔ細胞、又はそれらの亜集団のうちの１つ以上について濃縮されている細胞集団である。細胞は、リンパ球又はリンパ球の集団／亜集団を有する細胞試料を得、かつ／又は濃縮するための当該技術分野で既知の様々な単離又は精製方法を使用して、１つ以上の対象からの生物学的試料（血液、組織など）から得られ得、方法には、例えば、フィコール勾配分離、抗体、テトラマーなどを使用した磁気分離又はフローサイトメトリーのいずれかによる陽性及び陰性選択技法が含まれる。特定の実施形態では、リンパ球集団は、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、αβ　Ｔ細胞、及びγδＴ細胞のうちの１つ以上について濃縮される。特定の実施形態では、スクリーニング方法は、リンパ球表面に発現される機能性抗原特異的受容体を有するリンパ球を含む。特定の実施形態では、リンパ球集団は、ＣＡＲ発現性又は操作されたＴＣＲ発現性リンパ球を含む。特定の実施形態では、リンパ球集団は、不死化細胞株である。更になる実施形態では、細胞株は、ＣＡＲ又は操作されたＴＣＲを発現するように改変されている。特定の実施形態では、リンパ球集団ＮＫ細胞株（例えば、ＮＫ－９２又は改変バリアント）。特定の実施形態では、リンパ球集団は、対象又は特定の疾患若しくは人口統計学的プロファイルを有する対象に由来する。かかる疾患には、本明細書に記載されるものなどのがん、又は感染性疾患が含まれる。

【０１５３】

本明細書に開示されるスクリーニング方法は、リンパ球集団においてバーコード化遺伝子のコレクションを発現させることを必要とする。核酸を細胞に導入するための方法には、ウイルス媒介性及び非ウイルス媒介性が含まれる。特定の場合、方法は、好適なレトロウイルス又はレンチウイルスベクターを使用して細胞集団に送達されるバーコード化ＯＲＦライブラリを利用する（例えば、Ｓａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１８　Ａｐｒ　５；１７３（２）：４９９－５１４．ｅ２及びＹａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１１　Ｊｕｎ　２６；８（８）：６５９－６１を参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる）。特定の実施形態では、リンパ球集団の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％が、スクリーニングされる遺伝子を送達するベクターで形質導入される。形質導入のより高い効率は、特に、より小さいか又はよりまれなリンパ球集団を分析するときに有利であるが、特定の実施形態では、方法は、スクリーニングされる遺伝子を発現する細胞について細胞集団を更に濃縮する１つ以上の選択ステップを含む。例えば、薬剤耐性遺伝子（例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子）を、形質導入細胞の選択を容易にするために、遺伝子送達ベクターに含めることができる。特定の実施形態では、遺伝子コード構築物は、フローサイトメトリーを使用した形質導入細胞の更になる単離又は濃縮を促進する選択遺伝子（例えば、蛍光タンパク質、ＧＦＰ）を含む。

【０１５４】

特定の実施形態では、方法は、プロモーター及び／又は他の調節エレメントに操作可能に連結されたバーコード化遺伝子の送達を含む。プロモーターの選択は、標的細胞型（すなわち、リンパ球集団）、所望のレベルの遺伝子発現、及び／又は発現の期間などの要因に依存し得る。好適なプライマーが、本明細書に提供される。特定の実施形態では、プロモーターの選択は、方法の効率又は有効性を決定し、驚くべき利点を付与する。特定の実施形態では、プロモーターは、伸長因子－１αショート（ＥＦＳ）プロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、伸長因子－１αショート（ＥＦＳ）プロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターである。特定の実施形態では、ＣＭＶプロモーターは、それがＥＦＳプロモーターよりも高いレベルの発現を提供する場合に好ましい。特定の実施形態では、プロモーターは、ホスホグリセレートキナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーターである。なお更なる実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

【０１５５】

特定の実施形態では、提供される方法は、リンパ球集団の刺激後に１つ以上のエフェクター機能の評価を必要とし、エフェクター機能（複数可）における変化は、スクリーニングに含まれる外因性遺伝子の発現による変化した応答を示している。本明細書で使用される「刺激」という用語は、リンパ球の刺激分子がその同族のリガンドと結合し、それによってシグナル伝達さえ媒介することによって誘導された一次応答を指す。特定の実施形態では、方法は、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体を介してシグナル伝達を誘導する刺激を含む。刺激は、ＴＧＦ－βの下方調節、及び／又は細胞骨格構造の再編成などの特定の分子の変化した発現を媒介することができる。

【０１５６】

「刺激分子」という用語は、免疫細胞、例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又はＢ細胞によって発現される分子を指し、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくともいくつかの局面のために刺激的な方法で免疫細胞の活性化を調節する細胞質シグナル伝達配列（複数可）を提供する。一態様では、シグナルは、例えば、ペプチド又はポリクローナル架橋が加えられたＭＨＣ分子とのＴＣＲ／ＣＤ３複合体の結合によって開始される一次シグナルであり、増殖、活性化、分化、及びアポトーシスに対する耐性を含むがこれらに限定されない応答をもたらす。

【０１５７】

開示される方法は、ポリクローナル刺激及び非特異的刺激の使用を含む、様々な手段に従って細胞を刺激するように適応することができる。特定の実施形態では、細胞は、リンパ球細胞表面でのエピトープに対して特異的である、結合したか又は可溶性の抗体を使用して刺激される。特定の実施形態では、抗体は、細胞の表面で抗原受容体に結合し、架橋する。特定の実施形態では、リンパ球は、抗原特異的な手段で刺激される。特定の実施形態では、方法は、抗体、サイトカイン、抗原、超抗原、抗原提示細胞、がん細胞、及びがん細胞株のうちの１つ以上とともにリンパ球を培養することの１つ以上でリンパ球集団を刺激することを含む。特定の実施形態では、リンパ球集団は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体とのインキュベーションを介して活性化されるＴ細胞を含む。リンパ球はまた、活性化、増殖、分化、アポトーシス、及び／又は生存を促進するサイトカインとともに培養され得る。

【０１５８】

「抗原提示細胞」という用語は、それらの表面で主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）と複合体化された外来抗原を提示するアクセサリー細胞（例えば、Ｂ細胞、樹状細胞など）などの免疫系細胞を指す。Ｔ細胞は、それらのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を使用して、これらの複合体を認識し得る。ＡＰＣは抗原を処理し、それらをＴ細胞に提示する。特定の実施形態では、抗原提示細胞は、ＣＡＲ又は操作されたＴＣＲを発現するリンパ球における応答を誘導する。特定の実施形態では、抗原提示細胞は、がん細胞株である。

【０１５９】

特定の実施形態では、リンパ球の刺激は、外因性遺伝子の発現の結果として変化した応答を有する細胞を特定する。変化した応答には、増殖の程度、生存、アポトーシス、表現型変化（例えば、表面マーカー、サイズ）、サイトカイン若しくはケモカインの産生及び／又は分泌、並びに細胞傷害性の可能性における変化が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、リンパ球の増殖は、刺激の前に、細胞を色素（例えば、ＣＦＳＥ又はＣｅｌｌＴｒａｃｅ）で標識することによって決定される。特定の実施形態では、ＣＤ６９、ＣＤ２５、ＯＸ４０Ｌ（ＣＤ１５４）、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ５４、ＭＨＣ－ＩＩ、ＣＤ１３７、ＣＤ４４、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ１０７ａ、ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＴＩＧＩＴ、ＶＩＳＴＡ、Ｂ７－Ｈ３、ＢＴＬＡ、及びＳＩＧＬＥＣ１５のうちの１つ以上を含む、リンパ球でのマーカーの発現が、刺激される細胞を特定及び／又は単離するために決定される。特定の実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＩＬ１２、ＩＬ１８、ＩＬ２１、ＩＬ２３、ＬＴＡ、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ１０、ＩＬ１３、ＴＧＦｂｅｔａ、ＩＬ１７、ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、ＣＣＬ３、

ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＭＣＰ－３、ＣＸＣＬ９、ＭＩＰ１α、ＩＬ８、ＰＤＧＦ－ＡＡ、ＩＰ１０、ＩＬ２２、ＩＬ３、ＭＣＰ－１、ＩＬ９、ＭＤＣ、ｓＣＤ４０Ｌ、及びＭ－ＣＳＦのうちの１つ以上を含むサイトカイン又はケモカインの産生及び／又は分泌が、刺激される細胞を特定及び／又は単離するために決定される。特定の実施形態では、マーカー、サイトカイン、及び／又はケモカインの発現は、相対的なレベルの発現を含む、発現に基づいた細胞の選別を容易にするフローサイトメトリーによって決定される。特定の実施形態では、リンパ球は、細胞傷害性の可能性を示しているタンパク質を発現する。特定の実施形態では、パーフォリン及び／又はグランザイムの発現が決定される。

【０１６０】

刺激されたリンパ球の単離に続いて、発現された遺伝子の特定は、遺伝子及び／又はバーコード配列のＰＣＲ増幅によって決定される。特定の実施形態では、ＰＣＲは、リンパ球から得られたゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）で行われる。特定の実施形態では、逆転写ステップは、細胞トランスクリプトームから、及び／又は外因性遺伝子及びバーコードｍＲＮＡ転写物から、ｃＤＮＡを生成するために行われる。次いで、増幅されたＤＮＡ産物を配列決定して、単離されたリンパ球で発現される外因性遺伝子を特定し、かつ／又は単離されたリンパ球の集団における外因性遺伝子の相対発現を定量する。特定の実施形態では、開示されるスクリーニング方法は、全トランスクリプトーム分析、全ゲノム分析、ゲノムの全領域又は標的領域のバーコード化配列決定、並びにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない技法を使用する、単離されたリンパ球のＲＮＡ及び／又はＤＮＡ配列決定を含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡ配列決定は、プロテオーム分析と組み合わせて行われる。特定の実施形態では、方法は、例えば、フローサイトメトリーを使用した、細胞表面又は細胞内タンパク質の検出を含む。特定の実施形態では、方法は、当該技術分野で報告された方法を使用して追加の分子モダリティをプロファイリングすることと組み合わせたバーコード化遺伝子の検出又は特定を含み、これとしては、例えば、単一細胞配列決定分析（例えば、１０Ｘゲノミクスマルチオームプラットフォーム）、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）（例えば、Ｈａｑｕｅ ｅｔ ａｌ．Ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ ｇｕｉｄｅ ｔｏ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ＲＮＡ－ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｆｏｒ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，９，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：７５（２０１７）、Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ａｎｄ ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ｐｉｐｅｌｉｎｅｓ．Ｅｘｐ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．２０１８ Ａｕｇ ７；５０（８）：９６を参照）、細胞ハッシング（例えば、Ｓｔｏｅｃｋｉｕｓ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｈａｓｈｉｎｇ ｗｉｔｈ ｂａｒｃｏｄｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｅｎａｂｌｅｓ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｉｎｇ ａｎｄ ｄｏｕｂｌｅｔ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｆｏｒ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ｇｅｎｏｍｉｃｓ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ．２０１８；１９：２２４を参照）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－Ｓｅｑ．（例えば、Ｄｉｘｉｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ：Ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｗｉｔｈ ｓｃａｌａｂｌｅ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ＲＮＡ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｐｏｏｌｅｄ ｇｅｎｅｔｉｃ ｓｃｒｅｅｎｓ．Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｄｅｃ １５；１６７（７）：１８５３－１８６６．ｅ１７を参照）、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ（例えば、Ｄａｔｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｏｏｌｅｄ ＣＲＩＳＰＲ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｗｉｔｈ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｒｅａｄｏｕｔ Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１７ Ｍａｒ；１４（３）：２９７－３０１を参照）、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ（例えば、Ｊａｉｔｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｂｙ Ｌｉｎｋｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｐｏｏｌｅｄ Ｓｃｒｅｅｎｓ ｗｉｔｈ Ｓｉｎｇｌｅ－Ｃｅｌｌ ＲＮＡ－Ｓｅｑ Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｄｅｃ １５；１６７（７）：１８８３－１８９６．ｅ１５を参照）、拡張ＣＲＩＳＰＲ－コンパチブルＣＩＴＥ－ｓｅｑ（ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ）（例えば、Ｍｉｍｉｔｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏ

ｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅｓ，ｃｌｏｎｏｔｙｐｅｓ ａｎｄ ＣＲＩＳＰＲ ｐｅｒｔｕｒｂａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１９ Ｍａｙ；１６（５）：４０９－４１を参照）、並びにトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化－ｓｅｑ（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）（例えば、Ｓｔｏｅｃｋｉｕｓ ｅｔ ａｌ．Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｅｐｉｔｏｐｅ ａｎｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１７ Ｓｅｐ；１４（９）：８６５－８６８を参照）が挙げられる。

【０１６１】

ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑ

個々の遺伝子の作用機序のより包括的な見解を得るために、及びそれらが誘導する表現型変化の多次元的な説明を提供するために、直接ＯＲＦ捕捉を用いた単一細胞配列決定戦略が本明細書において記載される。この態様の実施形態の概要が、図１８Ａに提供される。本明細書で言及する場合、「オープンリーディングフレームｍＲＮＡ」又はＯＲＦ ｍＲＮＡという用語は、目的の遺伝子のコード配列を指すだけでなく、いくつかの実施形態では、バーコード及び／又は選択マーカー、例えば、ピュロミシンを含み得る下流配列も含む。ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑ（過剰発現－コンパチブルＣＩＴＥ－ｓｅｑ）と称されるこのアプローチは、表面抗原及びＣＲＩＳＰＲ摂動を定量化するために開発された以前のアプローチに基づいて構築され、異なるＯＲＦを有するＴ細胞のプールの高スループット、単一細胞分析を可能にする。簡単に説明すると、レンチウイルスに組み込まれたＯＲＦからのｍＲＮＡは、ＯＲＦの下流の転写物の定常配列に結合するプライマーによって特異的に逆転写され、鋳型切り替え中に細胞トランスクリプトームとともにバーコード化される。次いで、遺伝子発現及びＯＲＦ発現ライブラリの別個の構築のために、もたらされたｃＤＮＡプールが分割される。

【０１６２】

したがって、別の態様では、目的のＯＲＦの過剰発現の個々の細胞への効果を分析する方法が提供される。方法は、目的のＯＲＦをコードする核酸を含む発現カセットを細胞に導入することと、細胞内で当該ＯＲＦを過剰発現させることと、を含む。ＯＲＦの過剰発現は、ＣＭＶ、ＥＦ－１ａ、ＣＡＧ、ＰＫＧなどの強力なプロモーターの使用によって達成され得る。かかるプロモーターは、当該技術分野で既知である。

【０１６３】

個々の細胞に由来する第１のセットの核酸は、共通のバーコード配列を有するオリゴヌクレオチドと一緒に、別個の分画に提供され、オリゴヌクレオチドは、ビーズに結合される。バーコード配列は、これらの核酸の特性評価時に、それらが同じ細胞に由来しているとして帰属され得るように、独自の識別子を提供する。すなわち、オリゴヌクレオチドは、所与の分画におけるオリゴヌクレオチド間では、そこに含有される核酸バーコード配列が同じであるが、異なる分画間では、オリゴヌクレオチドが異なるバーコード配列を有するように分画される。核酸バーコード配列は、オリゴヌクレオチドの配列内に６～約２０個以上のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、バーコード配列の長さは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、又はそれより長いヌクレオチドであり得る。いくつかの場合では、バーコード配列の長さは、少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、又はそれより長いヌクレオチドであり得る。場合によっては、バーコード配列の長さは、最大で６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個、又はそれより短いヌクレオチド以下であり得る。

【０１６４】

第１のセットの核酸は、内因性トランスクリプトームｍＲＮＡ及びＯＲＦ ｍＲＮＡの両方を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、個別の分画中の個々の細胞から放出される。いくつかの実施形態では、核酸は、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）などのリボ核酸（ＲＮＡ）を含む。本明細書で使用される場合、いくつかの実施形態では、分

画は、容器又はベッセル（例えば、ウェル、マイクロウェル、チューブ、ナノアレイ基材におけるスルーポート、例えば、ＢｉｏＴｒｏｖｅナノアレイ、又は他の容器）を指す。しかしながら、いくつかの実施形態では、区画又は分画は、流体流内で流動可能である分画を含む。これらの分画は、例えば、内側流体中心又はコアを取り囲む外側バリアを有するマイクロカプセル若しくはマイクロ－ベシクルから構成され得、又はそれらは、そのマトリックス内に材料を取り込みかつ／若しくは保持することができる多孔質マトリックスであり得る。しかしながら、いくつかの実施形態では、これらの分画は、非水性連続相、例えば、油相内の水性流体の液滴を含む。例えば、ＵＳ２０１５／０３７６６０９Ａ１を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞は、分画内の細胞の内容物を放出するために、溶解試薬と一緒に分画化され得る。かかる場合、溶解剤は、分画接合部／液滴生成ゾーンへの細胞の導入と同時に、又はその直前に、細胞懸濁液と接触させることができる。上記の細胞とともに共分画化された溶解剤に加えて、他の試薬も細胞とともに共分画化することができ、これには、例えば、プロテイナーゼＫなどのＤＮａｓｅ及びＲＮａｓｅ不活性化剤又は阻害剤、ＥＤＴＡなどのキレート剤、並びに核酸の後続の処理に対する異なる細胞溶解物成分の負の活性又は影響を除去するか、又は他の方法で低減するために用いられる他の試薬が含まれる。

【０１６５】

細胞のＤＮＡを断片化するエンドヌクレアーゼ、細胞の核酸断片を増幅させ、バーコードオリゴヌクレオチドを増幅した断片に結合させるために使用されるＤＮＡポリメラーゼ酵素及びｄＮＴＰなどの追加の試薬が、細胞と共分画化され。追加の試薬はまた、末端トランスフェラーゼ活性を有する酵素を含む、逆転写酵素、プライマー及びオリゴヌクレオチド、並びに鋳型切り替えに使用することができるスイッチオリゴヌクレオチド（本明細書では「スイッチオリゴ」とも呼ばれる）を含み得る。場合によっては、鋳型切り替えを使用して、ｃＤＮＡの長さを増加させることができる。鋳型切り替えの一例では、ｃＤＮＡは、鋳型、例えば、細胞ｍＲＮＡの逆転写から生成することができ、末端トランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素は、ｃＤＮＡの末端などで、鋳型によってコードされないｃＤＮＡに追加のヌクレオチド、例えば、ポリＣを付加することができる。スイッチオリゴは、追加のヌクレオチド、例えば、ポリＧに相補的な配列を含むことができる。ｃＤＮＡでの追加のヌクレオチド（例えば、ポリＣ）は、スイッチオリゴで追加のヌクレオチド（例えば、ポリＧ）に相補的な配列にハイブリダイゼーションすることができ、それによってスイッチオリゴは、逆転写酵素によって鋳型として使用されて、ｃＤＮＡを更に伸長させることができる。スイッチオリゴは、デオキシリボ核酸、リボ核酸、ロック核酸（ＬＮＡ）を含む修飾核酸、又は任意の組み合わせを含み得る。かかる試薬は、当該技術分野で既知である。例えば、Ｃｈｒｏｍｉｕｍ Ｎｅｘｔ ＧＥＭ Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｅｌｌ ５’ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｋｉｔｓ ｖ２ Ｕｓｅｒ Ｇｕｉｄｅ（ａｓｓｅｔｓ．ｃｔｆａｓｓｅｔｓ．ｎｅｔ／ａｎ６８ｉｍ７９ｘｉｔｉ／１Ａｐ６ｑＱｙｓｑ８０ｏＱＡＧａｃｅｍ７ＲＤ／６ｆ８９５７９６ｅ１８ｃ３８ａ１４ｅｆ１ｅ８ｂ８ｆｆ７９ａ８２ｃ／ＣＧ０００３３１＿ＣｈｒｏｍｉｕｍＮｅｘｔＧＥＭＳｉｎｇｌｅＣｅｌｌ５－ｖ２＿ＲｅｖＢ．ｐｄｆから入手可能）を参照されたく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６６】

方法は、ＲＴ－ＰＣＲを行って、内因性トランスクリプトームｃＤＮＡ及びＯＲＦ ｃＤＮＡを含む第１のセットの核酸に由来する第２のセットの核酸を生成することを更に含み、分画内の当該第２のセットの核酸は、共通の核酸バーコード配列を含むオリゴヌクレオチドに結合している。ポリＡ配列ではないＯＲＦ ｍＲＮＡで配列に特異的にアニーリングするオリゴヌクレオチドプライマーを含むＲＴ－ＰＣＲ試薬。いくつかの実施形態では、ＯＲＦ ｍＲＮＡで配列に特異的にアニーリングするオリゴヌクレオチドプライマーは、ライブラリの配列、例えば、耐性マーカー、例えば、ピューロマイシンのコード配列に共通である転写物の一部でｍＲＮＡにアニーリングする。これにより、共通の試薬セットを使用して、ＯＲＦライブラリからの多くのＯＲＦ配列の増幅が可能になる。いくつか

の実施形態では、１つ以上の第２の核酸配列を生成することは、１つ以上の第２の核酸配列を生じる条件下で、核酸を逆転写に供することを含む。いくつかの実施形態では、逆転写は、別個の分画で生じる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、別個の分画で提供され、ポリＴ配列を含む。いくつかの実施形態では、逆転写は、ポリＴ配列を核酸の各々の少なくとも一部にハイブリダイゼーションすることと、ポリＴ配列を鋳型指向様式で伸長することと、を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ポリＴ配列のハイブリダイゼーションを促進するアンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ランダムヘキサマーであることができる、ランダムプライミング配列を含む。いくつかの実施形態では、逆転写は、ランダムプライミング配列を核酸の各々の少なくとも一部にハイブリダイゼーションすることと、ランダムプライミング配列を鋳型指向様式で伸長することと、を含む。

【０１６７】

方法は、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第２のプライマーを含むＰＣＲ試薬を使用して、第２のセットの核酸を増幅させて第３のセットの核酸を生成することを更に含む。

【０１６８】

特定の実施形態では、方法は、第３のセットの核酸の一部を得ることと、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第３のプライマーを含む第２のセットのＰＣＲ試薬を使用してＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて第４のセットの核酸を生成することと、を含む。

【０１６９】

特定の実施形態では、方法は、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第４のプライマーを含む第３のセットのＰＣＲ試薬を使用して、第４のセットの核酸におけるＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて第５のセットの核酸を生成することを更に含む。

【０１７０】

第３、及び任意選択的に第５のセットの核酸は、次いで、断片化され、アダプターが、断片の両端に結合され、当該技術分野で既知の標準的な技法を使用して、次世代配列決定（ＮＧＳ）に供される。例えば、Ｋａｎｚｉ　ｅｔ　ａｌ，Ｎｅｘｔ　Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ａｎｄ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｆａｍｉｌｙ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ，Ｆｒｏｎｔ．Ｇｅｎｅｔ．，２３　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２０２０　｜　ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．３３８９／ｆｇｅｎｅ．２０２０．５４４１６２を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。また、ＵＳ２０１８／０２５１８２５Ａ１及びＵＳ２０１５／０３７６６０９を参照されたく、これらの両方は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７１】

特定の実施形態では、方法は、当該技術分野で報告された方法を使用して追加の分子モダリティをプロファイリングすることと組み合わせたバーコード化配列の検出又は特定を含み、これとしては、例えば、単一細胞配列決定分析（例えば、１０Ｘゲノミクスマルチオームプラットフォーム）、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）（例えば、Ｈａｑｕｅ　ｅｔ　ａｌ．Ａ　ｐｒａｃｔｉｃａｌ　ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　ＲＮＡ－ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｆｏｒ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，９，Ａｒｔｉｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ：７５（２０１７）、Ｈｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　ＲＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ａｎｄ　ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　ｐｉｐｅｌｉｎｅｓ．Ｅｘｐ　Ｍｏｌ　Ｍｅｄ．２０１８　Ａｕｇ　７；５０（８）：９６を参照）、細胞ハッシング（例えば、Ｓｔｏｅｃｋｉｕｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｈａｓｈｉｎｇ　ｗｉｔｈ　ｂａｒｃｏｄｅｄ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｅｎａｂｌｅｓ　ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｉｎｇ　ａｎｄ　ｄｏｕｂｌｅｔ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｆｏｒ　ｓｉｎｇｌｅ　ｃｅｌｌ　ｇｅｎｏｍｉ

ｃｓ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ．２０１８；１９：２２４を参照）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－Ｓｅｑ．（例えば、Ｄｉｘｉｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ：Ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｗｉｔｈ ｓｃａｌａｂｌｅ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ＲＮＡ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｐｏｏｌｅｄ ｇｅｎｅｔｉｃ ｓｃｒｅｅｎｓ．Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｄｅｃ １５；１６７（７）：１８５３－１８６６．ｅ１７を参照）、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ（例えば、Ｄａｔｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｏｏｌｅｄ ＣＲＩＳＰＲ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｗｉｔｈ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｒｅａｄｏｕｔ Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１７ Ｍａｒ；１４（３）：２９７－３０１を参照）、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ（例えば、Ｊａｉｔｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｄｉｓｓｅｃｔｉｎｇ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｉｒｃｕｉｔｓ ｂｙ Ｌｉｎｋｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｐｏｏｌｅｄ Ｓｃｒｅｅｎｓ ｗｉｔｈ Ｓｉｎｇｌｅ－Ｃｅｌｌ ＲＮＡ－Ｓｅｑ Ｃｅｌｌ．２０１６ Ｄｅｃ １５；１６７（７）：１８８３－１８９６．ｅ１５を参照）、拡張ＣＲＩＳＰＲ－コンパチブルＣＩＴＥ－ｓｅｑ（ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ）（例えば、Ｍｉｍｉｔｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅｓ，ｃｌｏｎｏｔｙｐｅｓ ａｎｄ ＣＲＩＳＰＲ ｐｅｒｔｕｒｂａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１９ Ｍａｙ；１６（５）：４０９－４１を参照）、並びにトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化－ｓｅｑ（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）（例えば、Ｓｔｏｅｃｋｉｕｓ ｅｔ ａｌ．Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｅｐｉｔｏｐｅ ａｎｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１７ Ｓｅｐ；１４（９）：８６５－８６８を参照）が挙げられる。

【０１７２】

本明細書に提供される本発明の説明に関して、本記載の組成物の各々は、別の実施形態で、本発明の方法に有用であることが意図される。加えて、本方法で有用な本明細書に記載の組成物の各々は、別の実施形態では、それ自体が本発明の実施形態であることも意図される。

【０１７３】

具体的な実施形態

１．ＬＴＢＲをコードする外因性核酸を含む、改変リンパ球。

２．ＬＴＢＲをコードする核酸が、細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、実施形態１に記載の改変リンパ球。

３．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断片、欠失、若しくはバリアントを含む、実施形態２に記載の改変リンパ球。

４．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５に欠失を有する、実施形態２又は３に記載の改変リンパ球。

５．リンパ球が、発現制御配列と、ＬＴＢＲをコードする核酸と、を含む発現カセットを含む、実施形態１～４のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

６．リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態１～５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

７．発現カセットが、ＣＡＲをコードする核酸を更に含む、実施形態５に記載の改変リンパ球。

８．リンパ球が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態１又は５に記載の改変リンパ球。

９．発現カセットが、ＴＣＲをコードする核酸を更に含む、実施形態８に記載の改変リンパ球。

１０．発現制御配列が、ＥＦ－１α、ＥＦＳ、又はＣＭＶプロモーターを含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

１１．ＬＴＢＲをコードする外因性核酸が、ｍＲＮＡである、実施形態１に記載の改変リンパ球。

１２．リンパ球が、Ｔ細胞である、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の改変リンパ球。
１３．リンパ球が、アルファベータＴ細胞又はガンマデルタＴ細胞、任意選択的にＶγ９Ｖδ２　Ｔ細胞である、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の改変リンパ球。
１４．リンパ球が、ＮＫ細胞である、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の改変リンパ球。
１５．リンパ球が、ＮＫ　Ｔ細胞である、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の改変リンパ球。
１６．ＣＡＲが、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（Ａｂｅｃｍａ（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標））、チサゲンレクルユーセル（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、又は図１９に見出されるもののうちの１つである、実施形態６、７、１０、又は１２～１５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。
１７．ＬＴＢＲをコードする核酸、及びウイルスタンパク質をコードする核酸を含む、ワクチン組成物。
１８．ＬＴＢＲをコードする核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、実施形態１７に記載のワクチン組成物。
１９．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断片、欠失、若しくはバリアントを含む、実施形態１８に記載の改変リンパ球。
２０．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５に欠失を有する、実施形態１８又は１９に記載の改変リンパ球。
２１．ウイルスタンパク質が、糖タンパク質である、実施形態１７～２０のいずれか１つに記載のワクチン組成物。
２２．糖タンパク質が、ウイルススパイクタンパク質である、実施形態２１に記載のワクチン組成物。
２３．ウイルススパイクタンパク質が、コロナウイルススパイクタンパク質である、実施形態２２に記載のワクチン組成物。
２４．ＬＴＢＲをコードする核酸が、ｍＲＮＡであるか、若しくはウイルススパイクタンパク質をコードする核酸が、ｍＲＮＡであるか、又はその両方である、実施形態１７～２３のいずれか１つに記載のワクチン組成物。
２５．キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
２６．Ｔ細胞受容体をコードする核酸、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
２７．ウイルスタンパク質をコードする核酸、及びＬＴＢＲをコードする核酸を含む、発現カセット。
２８．ＬＴＢＲをコードする核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、実施形態２５～２７のいずれか１つに記載の発現カセット。
２９．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断片、欠失、若しくはバリアントを含む、実施形態２８に記載の発現カセット。
３０．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５に欠失を有する、実施形態２８又は２９に記載の発現カセット。
３１．実施形態２５～３０のいずれか１つに対する発現カセットを含む改変リンパ球を含む、組成物。
３２．改変リンパ球を産生する方法であって、ＬＴＢＲをコードする外因性核酸を細胞に導入することを含む、方法。
３３．ＬＴＢＲをコードする核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、実施形態３２に記載の方法。
３４．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断

片、欠失、若しくはバリアントを含む、実施形態３２又は３３に記載の方法。
３５．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５において欠失を有する、実施形態３２～３４のいずれか１つに記載の方法。
３６．リンパ球が、発現制御配列と、ＬＴＢＲをコードする核酸と、を含む発現カセットを含む、実施形態３２～３５のいずれか１つに記載の方法。
３７．リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態３２～３６のいずれか１つに記載の方法。
３８．発現カセットが、ＣＡＲをコードする核酸を更に含む、実施形態３７に記載の方法。
３９．リンパ球が、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態３２～３６のいずれか１つに記載の方法。
４０．発現カセットが、ＴＣＲをコードする核酸を更に含む、実施形態３９に記載の方法。
４１．発現制御配列が、ＥＦ－１α（全長又は短縮化）又はＣＭＶプロモーターを含む、実施形態３６～４０のいずれか１つに記載の方法。
４２．ＬＴＢＲをコードする外因性核酸が、ｍＲＮＡである、実施形態３２～４２のいずれか１つに記載の方法。
４３．リンパ球が、Ｔ細胞、任意選択的に、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、又はＴｒｅｇ細胞である、実施形態３２～４２のいずれか１つに記載の方法。
４４．リンパ球が、アルファベータＴ細胞である、実施形態３２～４３のいずれか１つに記載の方法。
４５．リンパ球が、ガンマデルタＴ細胞、任意選択的にＶγ９Ｖδ２　Ｔ細胞である、実施形態３２～４３のいずれか１つに記載の方法。
４６．リンパ球が、ＮＫ細胞である、実施形態３２～４２のいずれか１つに記載の方法。
４７．リンパ球が、ＮＫ　Ｔ細胞である、実施形態３２～４２のいずれか１つに記載の方法。
４８．ＣＡＲが、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（Ａｂｅｃｍａ（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標））、チサゲンレクルユーセル（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、キメラ自己抗体受容体、又は図１９に見出されるもののうちの１つである、実施形態３７、３８、又は４１～４７のいずれか１つに記載の方法。
４９．リンパ球が、ＬＴＢＲをコードするｍＲＮＡでヌクレオフェクションされている、実施形態３２～４８のいずれか１つに記載の方法。
５０．がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、方法が、対象に、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の改変リンパ球、実施形態２５～３０のいずれか１つに記載の発現カセット、又は実施形態３１に記載の組成物を投与することを含む、方法。
５１．対象が、リンパ腫を有する、実施形態５０に記載の方法。
５２．対象が、固形腫瘍を有する、実施形態５０に記載の方法。
５３．対象が、白血病を有する、実施形態５０に記載の方法。
５４．対象が、多発性骨髄腫を有する、実施形態５０に記載の方法。
５５．対象が、ウイルス駆動がんを有する、実施形態５０に記載の方法。
５６．対象が、ＨＰＶを有する、実施形態５５に記載の方法。
５７．対象が、バーキットリンパ腫、肝臓がん、カポジ肉腫、子宮頸がん、頭部がん、頸部がん、肛門がん、口腔がん、膵臓がん、卵巣がん、黒色腫、咽頭がん、陰茎がん、成人Ｔ細胞リンパ腫、又はメルケル細胞がん腫であるがんを有する、実施形態５０に記載の方法。
５８．ウイルス性疾患を打ち負かすことを必要とする対象におけるウイルス性疾患を打

ち負かす方法であって、方法が、対象に、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組成物を投与することを含む、方法。

５９．疾患が、ＨＩＶ又はＨＰＶである、実施形態５８に記載の方法。

６０．自己免疫障害の治療を必要とする対象における自己免疫障害を治療する方法であって、方法が、対象に、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の改変リンパ球、実施形態２５～３０のいずれか１つに記載の発現カセット、又は実施形態３１に記載の組成物を投与することを含む、方法。

６１．増殖、又はサイトカイン産生及び／若しくは分泌を含むＴ細胞エフェクター機能を増加させる方法であって、方法が、実施形態２５～３０のいずれか１つに記載の発現カセットをＴ細胞に導入することを含む、方法。

６２．Ｔ細胞が、Ｔ細胞を打ち負かしてＬＴＢＲを過剰発現させる前にヒトから得られ、処理したＴ細胞がヒトに再導入される、実施形態６１に記載の方法。

６３．ワクチン組成物に対する応答を増加させる方法であって、対象に、ＬＴＢＲをコードする核酸を含むワクチンを共投与することを含む、方法。

６４．ＬＴＢＲをコードする核酸が、ＬＴＢＲ細胞内ドメイン、又はその断片若しくはバリアントをコードする、実施形態６３に記載の方法。

６５．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、配列番号２のアミノ酸２４９～４３５、又はその断片、欠失、若しくはバリアントを含む、実施形態６４に記載の方法。

６６．ＬＴＢＲ細胞内ドメインが、少なくともアミノ酸３９３～４３５に欠失を有する、実施形態６４又は６５に記載の方法。

６７．ＬＴＢＲの発現が、一過性である、実施形態６３～６６のいずれか１つに記載の方法。

６８．表１の遺伝子をコードする外因性核酸を含む、改変リンパ球。

６９．リンパ球が、発現制御配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットを含む、実施形態６８に記載の改変リンパ球。

７０．リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態６８又は６９に記載の改変リンパ球。

７１．発現カセットが、ＣＡＲをコードする核酸を更に含む、実施形態７０に記載の改変リンパ球。

７２．リンパ球が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態６８又は６９に記載の改変リンパ球。

７３．発現カセットが、ＴＣＲをコードする核酸を更に含む、実施形態７２に記載の改変リンパ球。

７４．発現制御配列が、ＥＦ－１α、ＥＦＳ、又はＣＭＶプロモーターを含む、実施形態６８～７３のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

７５．表１の遺伝子をコードする外因性核酸が、ｍＲＮＡである、実施形態６８に記載の改変リンパ球。

７６．リンパ球が、Ｔ細胞である、実施形態６８～７５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

７７．リンパ球が、アルファベータＴ細胞である、実施形態６８～７５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

７８．リンパ球が、ガンマデルタＴ細胞、任意選択的にＶγ９Ｖδ２　Ｔ細胞である、実施形態６８～７５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

７９．リンパ球が、ＮＫ細胞である、実施形態６８～７５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

８０．リンパ球が、ＮＫ　Ｔ細胞である、実施形態６８～７５のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

８１．ＣＡＲが、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲンビクルユーセル（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標

））、チサゲンレクルユーセル（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、又は図１９に見出されるもののうちの１つである、実施形態７０、７１、又は７４～８０のいずれか１つに記載の改変リンパ球。

８２．表１の遺伝子をコードする核酸、及びウイルスタンパク質をコードする核酸を含む、ワクチン組成物。

８３．ウイルスタンパク質が、糖タンパク質である、実施形態８２に記載のワクチン組成物。

８４．糖タンパク質が、ウイルススパイクタンパク質である、実施形態８３に記載のワクチン組成物。

８５．ウイルススパイクタンパク質が、コロナウイルススパイクタンパク質である、実施形態８４に記載のワクチン組成物。

８６．表１の遺伝子をコードする核酸が、ｍＲＮＡであるか、若しくはウイルススパイクタンパク質をコードする核酸が、ｍＲＮＡであるか、又はその両方である、実施形態８２～８５のいずれか１つに記載のワクチン組成物。

８７．キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列、及び表１の遺伝子をコードする核酸を含む、発現カセット。

８８．Ｔ細胞受容体をコードする核酸、及び表１の遺伝子をコードする核酸を含む、発現カセット。

８９．ウイルスタンパク質をコードする核酸、及び表１の遺伝子をコードする核酸を含む、発現カセット。

９０．実施形態８７～８９のいずれか１つの発現カセットを含む改変リンパ球を含む、組成物。

９１．表１の遺伝子をコードする外因性核酸を、リンパ球に導入することを含む、改変リンパ球を産生する、方法。

９２．リンパ球が、発現制御配列と、表１の遺伝子をコードする核酸と、を含む発現カセットを含む、実施形態９１に記載の方法。

９３．リンパ球が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態９１又は９２に記載の方法。

９４．発現カセットが、ＣＡＲをコードする核酸を更に含む、実施形態９３に記載の方法。

９５．リンパ球が、操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸を更に含む、実施形態９１又は９２に記載の方法。

９６．発現カセットが、ＴＣＲをコードする核酸を更に含む、実施形態９５に記載の方法。

９７．発現制御配列が、ＥＦ－１α（全長又は短縮化）又はＣＭＶプロモーターを含む、実施形態９１～９７のいずれか１つに記載の方法。

９８．表１の遺伝子をコードする外因性核酸が、ｍＲＮＡである、実施形態９１に記載の方法。

９９．リンパ球が、Ｔ細胞、任意選択的に、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、又はＴｒｅｇ細胞である、実施形態９１～９８のいずれか１つに記載の方法。

１００．リンパ球が、アルファベータＴ細胞である、実施形態９１～９９のいずれか１つに記載の方法。

１０１．リンパ球が、ガンマデルタＴ細胞である、実施形態９１～９８のいずれか１つに記載の方法。

１０２．リンパ球が、ＮＫ細胞である、実施形態９１～９８のいずれか１つに記載の方法。

１０３．リンパ球が、ＮＫ　Ｔ細胞である、実施形態９１～９８のいずれか１つに記載の方法。

１０４．ＣＡＲが、アキシカブタゲンシロルユーセル（Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標））、ブレクスカブタゲンアウトルーセル（Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標））、イデカブタゲン

ビクルユーセル（商標））、リソカブタゲンマラルユーセル（Ｂｒｅｙａｎｚｉ（登録商標））、チサゲンレクルユーセル（Ｋｙｒｍｒｉａｈ（登録商標））、又は図１９に見出されるもののうちの１つである、実施形態９３、９４、又は９７～１０３のいずれか１つに記載の方法。

１０５．リンパ球が、表１の遺伝子をコードするｍＲＮＡでヌクレオフェクションされている、実施形態９１～１０４のいずれか１つに記載の方法。

１０６．がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、方法が、対象に、６８～８１、実施形態８７～８９のいずれか１つに記載の発現カセット、又は実施形態９０に記載の組成物を投与することを含む、方法。

１０７．対象が、リンパ腫を有する、実施形態１０６に記載の方法。

１０８．対象が、固形腫瘍を有する、実施形態１０６に記載の方法。

１０９．対象が、白血病を有する、実施形態１０６に記載の方法。

１１０．対象が、多発性骨髄腫を有する、実施形態１０６に記載の方法。

１１１．対象が、ウイルス駆動がんを有する、実施形態１０６に記載の方法。

１１２．対象が、ＨＰＶを有する、実施形態１１１に記載の方法。

１１３．対象が、バーキットリンパ腫、肝臓がん、カポジ肉腫、子宮頸がん、頭部がん、頸部がん、肛門がん、口腔がん、咽頭がん、陰茎がん、成人Ｔ細胞リンパ腫、又はメルケル細胞がんであるがんを有する、実施形態１０６に記載の方法。

１１４．疾患の治療を必要とする対象における疾患を治療する方法であって、方法が、対象に、実施形態８２～８６のいずれか１つに記載の組成物を投与することを含む、方法。

１１５．疾患が、ＨＩＶである、実施形態１１４に記載の方法。

１１６．疾患が、ＨＰＶである、実施形態１１４に記載の方法。

１１７．疾患が、自己免疫障害である、実施形態１１４に記載の方法。

１１８．増殖、又はサイトカイン産生及び／若しくは分泌を含むＴ細胞エフェクター機能を増加させる方法であって、方法が、実施形態８７～８９のいずれか１つに記載の組成物をＴ細胞に導入することを含む、方法。

１１９．Ｔ細胞が、Ｔ細胞を処理して表１の遺伝子を過剰発現させる前にヒトから得られ、処理したＴ細胞がヒトに再導入される、実施形態１１８に記載の方法。

１２０．ワクチン組成物に対する応答を増加させる方法であって、表１の遺伝子をコードする核酸をワクチンと共投与することを含む、方法。

１２１．表１の遺伝子の発現が、一過性である、実施形態１１８～１２０のいずれか１つに記載の方法。

１２２．表１の遺伝子が、ＬＴＢＲ、ＡＤＡ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ　ＣＡＬＭＬ３　ＭＲＰＬ５１、ＤＢＩ　ＧＰＮ３、ＩＴＭ２Ａ、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＡＴＦ６Ｂ、ＡＨＣＹ、ＤＵＰＤ１、又はＡＫＲ１Ｃ４である、実施形態６８～１２１のいずれか１つに記載の改変リンパ球、組成物、発現カセット、又は方法。

１２３．改変リンパ球において外因的に発現されるとき、改変リンパ球の治療機能を変化させる遺伝子を特定する方法であって、方法が、

（ａ）リンパ球集団を得ることと、

（ｂ）各ウイルスベクターが、１つ以上のバーコードに連結され得る遺伝子をコードする、複数のウイルスベクターでリンパ球集団を形質導入することと、

（ｃ）形質導入したリンパ球を刺激して、活性化、増殖、及び／又はエフェクター機能を誘導することと、

（ｄ）（ｃ）のリンパ球集団から形質導入したリンパ球を単離することと、

（ｅ）単離されたリンパ球における遺伝子及び／又は連結されたバーコードの存在を検出することと、を含み、

検出された遺伝子が、遺伝子を発現する改変リンパ球の治療機能を変化させるのに有効である、方法。

１２４．遺伝子が、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）又は非コードＲＮＡ、任

意選択的に、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）若しくは長非コードＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ、長ｎｃＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列である、実施形態１２３に記載の方法。

１２５．リンパ球集団が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又はそれらの亜集団のうちの１つ以上について濃縮されており、任意選択的に、細胞がヒトである、細胞集団を含む、実施形態１２３又は１２４に記載の方法。

１２６．リンパ球集団が、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、αβＴ細胞、及びγδＴ細胞のうちの１つ以上について濃縮されている、実施形態１２５に記載の方法。

１２７．リンパ球集団が、ＣＡＲ　Ｔ細胞を含む、実施形態１２３～１２６のいずれか１つに記載の方法。

１２８．リンパ球集団が、その表面に発現された操作されたＴＣＲを含むリンパ球を含む、実施形態１２３～１２６のいずれか１つに記載の方法。

１２９．リンパ球集団が、細胞株を含む、実施形態１２３～１２８のいずれか１つに記載の方法。

１３０．複数のウイルスベクターが、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のライブラリを含む、実施形態１２３～１２９のいずれか１つに記載の方法。

１３１．ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターを含む、実施形態１２３～１３０のいずれか１つに記載の方法。

１３２．（ｂ）が、リンパ球集団の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％を形質導入することを含む、実施形態１２３～１３１のいずれか１つに記載の方法。

１３３．ウイルスベクターが、伸長因子－１αショート（ＥＦＳ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、又はホスホグリセリン酸キナーゼ－１（ＰＧＫ）プロモーターを有する発現カセットを含む、実施形態１２３～１３２のいずれか１つに記載の方法。

１３４．ウイルスベクターが、選択遺伝子又はマーカーをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１２３～１３３のいずれか１つに記載の方法。

１３５．改変リンパ球が、γδＴ細胞又はαβ　Ｔ細胞である、実施形態１２３～１３４のいずれか１つに記載の方法。

１３６．改変リンパ球が、Ｖγ９－又はＶγ９Ｖδ２　ＴＣＲを発現するＴ細胞である、実施形態１２３～１３４のいずれか１つに記載の方法。

１３７．改変リンパ球が、ＣＡＲ　Ｔ細胞である、実施形態１２３～１３６のいずれか１つに記載の方法。

１３８．改変リンパ球が、内因性抗原受容体、任意選択的にＴＣＲの発現に基づいて選択されている、実施形態１２３～１３６のいずれか１つに記載の方法。

１３９．形質導入したリンパ球を刺激することが、リンパ球を、抗体、サイトカイン、抗原、超抗原、抗原提示細胞、がん細胞、及びがん細胞株のうちの１つ以上とともに培養することを含む、実施形態１２３～１３８のいずれか１つに記載の方法。

１４０．形質導入したリンパ球を刺激することが、ＴＣＲ刺激を含み、任意選択的にＣＤ３／ＣＤ２８刺激を含む、実施形態１２３～１３８のいずれか１つに記載の方法。

１４１．形質導入したリンパ球を細胞増殖色素で標識することと、子孫細胞を単離することと、を更に含む、実施形態１２３～１４０のいずれか１つに記載の方法。

１４２．（ｄ）が、１つ以上の細胞表面マーカー及び／又は１つ以上のエフェクター機能及び／又は１つ以上の分泌サイトカインを発現する細胞を特定することを含む、実施形態１２３～１４１のいずれか１つに記載の方法。

１４３．１つ以上の細胞表面マーカーが、ＣＤ６９、ＣＤ２５、ＯＸ４０Ｌ（ＣＤ１５４）、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ５４、ＭＨＣ－ＩＩ、ＣＤ１３７、ＣＤ４４、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ１０７ａ、ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＴＩＧＩＴ、ＶＩＳＴＡ、Ｂ７－Ｈ３、ＢＴＬＡ、及びＳＩＧＬＥＣ１５を含む、実施形態１４２に記載の方法。

１４４．１つ以上のエフェクター機能が、サイトカイン又はケモカインの産生及び／又は分泌を含み、任意選択的に、サイトカイン又はケモカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＩＦＮγ、ＴＮＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ７、ＩＬ１５、ＩＬ１２、ＩＬ１８、ＩＬ２１、ＩＬ２３、ＬＴＡ、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ１０、ＩＬ１３、ＴＧＦベータ、ＩＬ１７、ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、及びＣＣＬ５のうちの１つ以上である、実施形態１２３～１４３に記載の方法。

１４５．１つ以上のエフェクター機能が、細胞傷害性の可能性を含み、任意選択的に、細胞傷害性の可能性が、パーフォリン及び／又はグランザイムの発現によって特定される、実施形態１２３～１４４のいずれか１つに記載の方法。

１４６．（ｅ）が、単離されたリンパ球、並びに遺伝子及び／又はバーコード配列のＰＣＲ増幅から、ゲノムＤＮＡを得ることを含む、実施形態１２３～１４５のいずれか１つに記載の方法。

１４７．（ｅ）が、単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む、実施形態１２３～１４６のいずれか１つに記載の方法。

１４８．（ｅ）が、フローサイトメトリー分析、細胞ハッシング、単一細胞配列決定分析、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ、ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ、又はトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）を含む、実施形態１２３～１４７のいずれか１つに記載の方法。

１４９．個々の細胞に対する目的のＯＲＦの過剰発現の効果を分析する方法であって、

（ａ）目的のＯＲＦをコードする核酸を含む発現カセットを細胞に導入し、該ＯＲＦを過剰発現させることと、

（ｂ）個々の細胞に由来する第１のセットの核酸及び第１のバーコード配列を有する第１のオリゴヌクレオチドを別個の分画に提供することであって、オリゴヌクレオチドがビーズに結合されており、第１のセットの核酸が内因性トランスクリプトームｍＲＮＡ及びＯＲＦ　ｍＲＮＡを含む、提供することと、

（ｃ）ＲＴ－ＰＣＲを行って、第１のセットの核酸に由来する第２のセットの核酸を生成することであって、分画内の該第２のセットの核酸が、それらに第１の核酸バーコード配列を含む第１のオリゴヌクレオチドを結合させており、ＲＴ－ＰＣＲが、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｍＲＮＡ上の配列に特異的にアニーリングするプライマーを含むＲＴ－ＰＣＲ試薬を使用して行われ、第２のセットの核酸が、内因性トランスクリプトームｃＤＮＡ及びＯＲＦ　ｃＤＮＡを含む、生成することと、

（ｄ）ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第２のプライマーを含むＰＣＲ試薬を使用して、第２のセットの核酸を増幅させて、第３のセットの核酸を生成することと、

（ｅ）バーコード配列、トランスクリプトームｃＤＮＡ、及び／又はＯＲＦ　ｃＤＮＡを検出すること及び／又は配列決定することと、を含む、方法。

１５０．（ｄ’）第３のセットの核酸の一部を得ることと、ポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第３のプライマーを含む第２のセットのＰＣＲ試薬を使用して、ＯＲＦ　ｃＤＮＡを増幅させて、第４のセットの核酸を生成することと、を更に含む、実施形態１４９に記載の方法。

１５１．（ｄ”）を含む第３のセットのＰＣＲ試薬を使用して、第４のセットの核酸におけるＯＲＦ　ｃＤＮＡポリＡ配列ではないＯＲＦ　ｃＤＮＡ上の配列に特異的にアニーリングする第４のプライマーを増幅させて、第５のセットの核酸を生成することを更に含む、実施形態１５０に記載の方法。

１５２．（ａ）の細胞を、第１のオリゴヌクレオチドに結合した抗体又は抗体断片を含む構築物と接触させることを更に含む、実施形態１４９～１５１のいずれか１つに記載の方法。

１５３．単一細胞トランスクリプトーム及び／又はプロテオーム分析を更に含む、実施形態１４９～１５２のいずれか１つに記載の方法。

１５４．（ｅ）が、フローサイトメトリー分析、細胞ハッシング、単一細胞配列決定分析、単一細胞ＲＮＡ配列決定（ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ）、Ｐｅｒｔｕｒｂ－ｓｅｑ、ＣＲＯＰ－ｓｅｑ、ＣＲＩＳＰ－ｓｅｑ、ＥＣＣＩＴＥ－ｓｅｑ、又はトランスクリプトーム及びエピトープの細胞インデックス化（ＣＩＴＥ－ｓｅｑ）を含む、実施形態１４９～１５３のいずれか１つに記載の方法。

【０１７４】

以下の実施例は例示のみの目的のために提供され、いかなる方式でも本発明がこの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【実施例】

【０１７５】

実施例１

材料及び方法

初代ヒトＴ細胞の単離及び培養

匿名化した健常なドナーからの末梢血を含有する標準的なバフィーコートが、ＮｅｗＹｏｒｋ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｅｎｔｅｒによって収集され、そこからＩＲＢ免除プロトコルの下で購入した。全てのドナーは、インフォームドコンセントを提供した。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）勾配遠心分離を使用してバフィーコートから単離した。ほとんどのアッセイでは、ＣＤ８$^{+}$及びＣＤ４$^{+}$が、同一ドナーから連続的に単離された。最初に、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐヒトＣＤ８陽性選択キットＩＩ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を使用して、磁気陽性選択によって単離した。次に、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐヒトＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞単離キット（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を使用して、負の磁気選択によって得られたフロースルーから単離した。γδＴ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐヒトガンマ／デルタＴ細胞単離キット（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を使用した磁気負選択によって単離した。単離後直ちに、Ｔ細胞を、１０ｎｇ　ｍｌ$^{-1}$組換えヒトＩＬ－２（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を補充したＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ－ＸＦ　Ｔ細胞拡張培地（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）からなるＴ細胞培地に再懸濁させた。

【０１７６】

Ｔ細胞の活性化は、１ｍｌ当たり細胞10^{6}個当たり２５μｌを使用して、ＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔヒトＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔ細胞活性化剤（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を用いて行った。典型的には、Ｔ細胞は、単離の２４時間後に濃縮レンチウイルスで形質導入した。いくつかの実験では、Ｔ細胞は、単離の２４時間後にインビトロ転写したｍＲＮＡで、又は単離の４８時間後にＣａｓ９タンパク質でエレクトロポレーションした。単離の７２時間後に、レンチウイルスによって形質導入したＴ細胞を、２μｇ　ｍｌ$^{-1}$ピューロマイシンを用いて選択した。

【０１７７】

２～３日毎に、Ｔ細胞を分割するか、又は培地を置き換えて、１ｍｌ当たり細胞1×10^{6}～2×10^{6}個の細胞密度を維持した。レンチウイルスによって形質導入したＴ細胞を、培養期間中、２μｇ　ｍｌ$^{-1}$ピューロマイシンを含有する培地中で維持した。Ｔ細胞を、単離後１４日から２１日の間で表現型若しくは機能アッセイのために使用するか、又はＢａｍｂａｎｋｅｒ細胞凍結培地（Ｂｕｌｌｄｏｇ　Ｂｉｏ）中で凍結保存した。γδＴ細胞を更に精製してから、ＴＣＲ架橋からもたらされる活性化誘導細胞死を防止するために、タンパク質キナーゼ阻害剤であるダサチニブの存在下で、抗Ｖγ９　ＰＥ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）及び抗ＰＥマイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を製造業者の推奨に従って使用した機能アッセイを行った[42]。びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫を有する患者からのＰＢＭＣは、Ｐｅｒｌｍｕｔｔｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄによって承認されたプロトコル（Ｓ１４－０２１６４）に従ってＰｅｒｌｍｕｔｔｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒから得た。

【０１７８】

ベクター設計及び分子クローニング
使用した全てのベクターは、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ（ＮＥＢ）を使用してクローニングした。図１Ａ～図１Ｂに示される実験では、ｐＨＡＧＥプラスミドからのレンチウイルス骨格を使用した[14]。他の全ての実験では、ｌｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２（Ａｄｄｇｅｎｅ　５２９６１）からの骨格を使用した。ＯＲＦは、スクリーニングで使用したゲノムスケールライブラリからのクローニングのためにＰＣＲ増幅した。
【０１７９】
ＰＣＲによってＧｉｂｓｏｎオーバーハングを添加した後、ＯＲＦ及びＰ２Ａ－ｐｕｒｏを、ＸｂａＩ－及びＥｃｏＲＩ－切断したｌｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２に挿入した。ＰａｃＩ及びＮｈｅＩ消化を使用して、ｓｇＲＮＡカセットをｌｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２から除去した。ＬＴＢＲ過剰発現及びノックアウト実験では、ｓｇＲＮＡカセットを除去しなかった。ＣＡＲをｇＢｌｏｃｋｓ（ＩＤＴ）として合成した。ＣＡＲ－ＯＲＦクローニングでは、ＣＡＲ－Ｐ２Ａ－ｐｕｒｏ－Ｔ２Ａ（部分的）を最初にＸｂａＩ切断及びＥｃｏＲＩ切断したｌｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２に挿入した。その後のＯＲＦ挿入では、プラスミドを、部分的Ｔ２Ａ及びＥｃｏＲＩ内に配置されたＨｐａＩで切断した。以下のベクターをＡｄｄｇｅｎｅに預けた：ｐＯＴ＿０１（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ＬＴＢＲ－２Ａ－ｐｕｒｏ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７０）、ｐＯＴ＿０２（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ｔＮＧＦＲ－２Ａ－ｐｕｒｏ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７１）、ｐＯＴ＿０３（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ＦＭＣ６．３－２８ｚ－２Ａ－ｐｕｒｏ－２Ａ－ＬＴＢＲ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７２）、ｐＯＴ＿０４（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ＦＭＣ６．３－ＢＢｚ－２Ａ－ｐｕｒｏ－２Ａ－ＬＴＢＲ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７３）、ｐＯＴ＿０５（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ＦＭＣ６．３－２８ｚ－２Ａ－ｐｕｒｏ－２Ａ－ｔＮＧＦＲ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７４）、及びｐＯＴ＿０６（ｌｅｎｔｉ－ＥＦＳ－ＦＭＣ６．３－ＢＢｚ－２Ａ－ｐｕｒｏ－２Ａ－ｔＮＧＦＲ，Ａｄｄｇｅｎｅ　１８１９７５）。
【０１８０】
ヌクレアーゼ及びＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ設計
全てのｓｇＲＮＡは、ＧＵＩＤＥＳウェブツールを使用して設計した[43]。最初のタンパク質コードエクソンを標的とし（ＧＵＩＤＥＳで可能になったタンパク質ファミリードメインを標的とすることを優先して）、オフターゲットを最小化し、オンターゲットスコアを最大化するガイドを選択した。Ｃａｓ９ヌクレアーゼヌクレオフェクションでは、精製したｓＮＬＳ－ＳｐＣａｓ９－ｓＮＬＳヌクレアーゼ（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）を使用した。
【０１８１】
ペアードエンド配列決定のためのＯＲＦライブラリプラスミドの調製
Ｅｎｄｕｒａエレクトロコンピテント細胞（Ｌｕｃｉｇｅｎ）を使用して、既に報告されているゲノムスケールＯＲＦライブラリ[14]を再増幅した。ＯＲＦ及び該当するバーコードの同一性は、ペアードエンド配列決定によって確認した。簡単に説明すると、プラスミドは、バーコードの下流を切断するＩ－ＳｃｅＩメガヌクレアーゼで最初に線状化した。次に、線形化したプラスミドは、ＴｎＹトランスポザーゼを使用してタグ付けした[44]。次に、ＴｎＹによって導入されたハンドルへのフォワードプライマー結合、及びバーコードの下流の配列へのリバースプライマー結合を使用して、断片化したプラスミドをＰＣＲ反応で増幅させた。全てのトランスポゾン及びＰＣＲプライマーオリゴヌクレオチドは、ＩＤＴによって合成された。もたらされたアンプリコンを、ＮｅｘｔＳｅｑ５００で配列決定した。フォワードリード（ＯＲＦを含有する）を、ＳＴＡＲ　ｖ．２．７．３ａ（マップ品質≧１０）を使用してＧＲＣｈ３８．１０１　ＣＤＳトランスクリプトームアノテーションにマッピングした[45]。ペアードエンドリードを使用して、定常プラスミド配列の下流にある２４ヌクレオチドバーコードも捕捉した。ＯＲＦバーコード組み合わせを表にし、配列決定又はＰＣＲエラーに起因し得る任意の偽対を排除することによって、この表を更にキュレートした。具体的には、並び替え検定を行って、ランダムチャンスよって期待されるＯＲＦ－バーコード組み合わせの最大数を特定した後、この最大数を超える

数を有するＯＲＦ－バーコードの組み合わせのみを保持した。リファレンスから全ての非コードエレメントを除外し、次に、２未満のレーベンシュタイン距離内にあったバーコードを崩壊させた。

【０１８２】

細胞培養

ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞をＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから得て、１０％Ｓｅｒｕｍ Ｐｌｕｓ－ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）で培養した。Ｎａｌｍ６、ジャーカット、及びＢｘＰＣ３細胞をＡＴＣＣから得、１０％Ｓｅｒｕｍ Ｐｌｕｓ－ＩＩを補充したＲＰＭＩ－１６４０で培養した。Ｃａｐａｎ－２細胞をＡＴＣＣから得、１０％Ｓｅｒｕｍ Ｐｌｕｓ－ＩＩを補充したマッコイ培地で培養した。γδ共インキュベーション実験では、細胞株を５０μＭのゾレドロン酸（Ｓｉｇｍａ）で２４時間前処理した。細胞株を、ＭｙｃｏＡｌｅｒｔ Ｐｌｕｓ（Ｌｏｎｚａ）を使用してマイコプラズマについてルーチン的に検査し、陰性であることが認められた。細胞株は、この試験で確証されなかった。

【０１８３】

レンチウイルス産生

ポリエチレンイミン直鎖ＭＷ２５０００（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、第３世代のレンチウイルス移入プラスミドを、パッケージングプラスミドｐｓＰＡＸ２（Ａｄｄｇｅｎｅ １２２６０）及びエンベローププラスミドｐＭＤ２．Ｇ（Ａｄｄｇｅｎｅ １２２５９）とともにＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に共トランスフェクトすることによって、レンチウイルスを産生した。７２時間後、上清を収集し、０．４５μｍのＳｔｅｒｉｆｌｉｐ－ＨＶフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に通してそれらを濾過し、レンチウイルス沈殿液（Ａｌｓｔｅｍ）を使用してウイルスを濃縮した。濃縮したレンチウイルスを、ＩＬ－２を含有するＴ細胞培地中に再懸濁させ、－８０℃で保存した。

【０１８４】

プールしたＯＲＦライブラリスクリーニング

プールしたＯＲＦライブラリスクリーニングでは、ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を、３名の健常なドナーからの少なくとも５００×１０^{6}個のＰＢＭＣから単離した。形質導入に使用されるレンチウイルスの量を力価測定して、２０～３０％の形質導入効率をもたらし、複数のＯＲＦが単一細胞に導入される可能性を最小限に抑えた。細胞を２μｇ ｍｌ－１ピューロマイシンを含有するＴ細胞培地中に維持し、２～３日毎に計数して、１ｍｌ当たり細胞１×１０^{6}～２×１０^{6}個の細胞密度を維持した。単離後１４日目に、Ｔ細胞を収集し、計数し、５μＭのＣＦＳＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で標識し、細胞１×１０^{6}個当たり１．５６μｌのＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）で刺激した。ライブラリの１，０００×適用範囲を表す細胞の小分けをこのステップで凍結して、刺激前対照として使用した。刺激の４日後、細胞を収集し、ライブラリの１，０００×適用範囲を表す細胞の小分けを凍結して、選別前対照として使用した。残りの細胞を、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ Ｖｉｏｌｅｔ 細胞生存率色素（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で染色し、ＣＦＳＥ^{低}細胞（分布の下部１５％に対応する）を、Ｓｏｎｙ ＳＨ８００Ｓ細胞ソーターを使用して選別した。ゲノムＤＮＡを単離し、ＯＲＦバーコードを増幅させ、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプターを添加する２ラウンドのＰＣＲを行った[46]。

【０１８５】

プールしたＯＲＦスクリーニング分析

ほとんどの分析では、トリミング及びアライメントの前に、全３名のドナーからの同数のリードを、ビン毎に組み合わせた。バーコードは、Ｃｕｔａｄａｐｔ ｖ．１．１３（－ｍ２４－ｅ０．１－－ｄｉｓｃａｒｄ－ｕｎｔｒｉｍｍｅｄ）を用いてアダプタートリミングした後、Ｂｏｗｔｉｅ ｖ．１．１．２（－ｖ１－ｍ１－－ｂｅｓｔ－－ｓｔｒａｔａ）を使用してリファレンスライブラリにマッピングした[47、48]。その後の全ての分析は、Ｒ４．０．０．２とともにＲＳｔｕｄｉｏ ｖ．１．１．４１９で行った。個々

のバーコード濃縮を計算するために、バーコードカウントを試料当たりのリードの総数（疑似カウントを加えた）に対して正規化し、log_2変換した。ＯＲＦ濃縮を計算するために、生のバーコードカウントを、正規化及びlog_2変換の前に遺伝子まで最初に崩壊させた。

【０１８６】

バーコード及び遺伝子の両方のレベルで濃縮分析を行った。バーコード濃縮に関する統計分析は、$CD4^+$及び$CD8^+$を複製として使用して、$CFSE^{低}$試料を対応する入力（刺激前）と比較して、ＭＡＧｅＣＫ[49]を使用して行った。ＯＲＦ濃縮に関する統計分析は、ＤＥＳｅｑ２を使用して行った[50]。バーコードを対応する遺伝子に崩壊させることによって生の遺伝子カウントを得た。$CFSE^{低}$試料を、$CD4^+$及び$CD8^+$を複製として使用して、対応する入力（刺激前及び選別前の両方）と比較した。ＤＥＳｅｑ２基準（log_2－変換倍率変化＞０．５、P_{adj}＜０．０５）に適合している遺伝子のＧＯ濃縮（生物学的プロセス）を、ｔｏｐＧＯパッケージ[51]を使用して行った。$CFSE^{低}$スクリーニング（ＤＥＳｅｑ２分析）で濃縮された遺伝子について、Ｄａｔａｂａｓｅ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ｅＱＴＬｓ，Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃｓ（ＤＩＣＥ；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｉｃｅ－ｄａｔａｂａｓｅ．ｏｒｇ／）からのデータを使用して、これらの遺伝子を$CD3$／$CD28$刺激後に差次的に発現された遺伝子とオーバーラップさせた[41]。差次的に発現された遺伝子について、以下のＤＩＣＥデータセットを使用した：「Ｔ細胞、ＣＤ４、ナイーブ」対「Ｔ細胞、ＣＤ４、ナイーブ［活性化］」、「Ｔ細胞、ＣＤ８、ナイーブ」対「Ｔ細胞、ＣＤ８、ナイーブ［活性化］」。有意差のある発現は、ＤＩＣＥデータセットで得られた通りだった（P_{adj}＜０．０５）。

【０１８７】

増殖アッセイ

形質導入したＴ細胞を、単離後１４日目に収集し、計数し、丸底９６ウェルプレートに、形質導入当たり三連ウェルの２セットで、１ウェル当たり細胞２．５×10^4個で播種した。１セットの三連ウェルを、１０ｎｇ ｍｌ$^{-1}$のＩＬ－２を補充したＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ－ＸＦ Ｔ細胞拡張培地中で培養し、別の１セットの三連ウェルは、１ｍｌの培地当たり１．５６μｌの$CD3$／$CD28$活性化剤で更に補充した。細胞を４日間培養し、次いで回収し、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ Ｖｉｏｌｅｔ細胞生存率色素で染色した。フローサイトメトリー取得前に、細胞を、１０％ｖ／ｖのＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｂｅａｄｓ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を添加したＤ－ＰＢＳに再懸濁させた。定量化のために、生存細胞事象の数を、試料当たりのビーズ事象の数に対して正規化した。次いで、各ＯＲＦについて、$CD3$／$CD28$活性化剤を補充したウェル中の正規化した生存細胞数は、Ｔ細胞増殖を定量化するために対照ウェル中の生存細胞の平均数によって除した。ドナーと$CD4^+$／$CD8^+$Ｔ細胞との間の比較を可能にするために、所与のＯＲＦで形質導入したＴ細胞の増殖を、該当するｔＮＧＦＲ対照の増殖に対して最終的に正規化した。

【０１８８】

カウントビーズアッセイに加えて、色素希釈アッセイを使用して増殖も測定した。このアッセイのために、形質導入Ｔ細胞を、単離後１４日目に収集し、Ｄ－ＰＢＳで洗浄し、次いで、Ｄ－ＰＢＳ中の５μＭのＣｅｌｌＴｒａｃｅ Ｙｅｌｌｏｗ（ＣＴＹ）で、２０分間、室温で標識した。過剰な色素を、１０％Ｓｅｒｕｍ Ｐｌｕｓ－ＩＩを補充した５倍過剰のＲＰＭＩ－１６４０で洗浄することによって除去した。次いで、標識した細胞を、ウェル当たり細胞２．５×10^4個で丸底９６ウェルプレートに播種した。１セットの三連ウェルを、補充したＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ－ＸＦ Ｔ細胞増殖培地（すなわち、ＩＬ－２無添加）で培養し、別の一セットの三連ウェルを、１ｍｌの培地当たり１０ｎｇ ｍｌ$^{-1}$のＩＬ－２及び１．５６μｌの$CD3$／$CD28$活性化剤で補充した。細胞を４日間培養し、次いで回収し、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ Ｖｉｏｌｅｔ細胞生存率色素で染色した。増殖指数の定量化のために、事象は最初にＦｌｏｗＪｏ（Ｔｒｅｅｓｔａｒ）で生存可

能なＴ細胞についてゲーティングし、ｆｌｏｗＦｉｔ及びｆｌｏｗＣｏｒｅパッケージ[52]を使用してＲ／ＲＳｔｕｄｉｏで更に分析するため送出した。非刺激細胞を使用して、異なる試料間の染色強度の差を説明するために、親集団のサイズ及び位置を決定した。次いで、これらのフィッティングした親集団パラメータを使用して、該当する刺激した試料のＣＴＹプロファイルをフィッティングさせ、細胞分裂及び染料希釈の結果として$\log_2$－間隔ピークを想定したガウス分布としてモデル化した。フィッティングしたＣＴＹプロファイルを、元のＣＴＹプロファイルと一致するか目視で検査し、増殖指数を計算するために使用した。増殖指数は、アッセイの開始時に存在した親細胞の計算された数で除した、全ての世代の細胞の合計として定義される。

【０１８９】

細胞表面及び細胞内マーカーにおけるフローサイトメトリー

ＣＤ２５（ＩＬ２ＲＡ）及びＣＤ１５４（ＣＤ４０Ｌ）定量化のために、染色の６時間前（$CD8^+$におけるＣＤ１５４染色）又は２４時間前（$CD4^+$及び$CD8^+$の両方におけるＣＤ２５染色、及び$CD4^+$におけるＣＤ１５４染色）に、Ｔ細胞をＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞10^6個当たり６．２５μｌ）で再刺激した。Ｋｉ－６７及び７－アミノ－アクチノマイシンＤ（７－ＡＡＤ）染色では、Ｔ細胞は、ＩＬ－２無添加のＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ－ＸＦ　Ｔ細胞増殖培地中で一晩静置し、次にＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞10^6個当たり２５μｌ）で２４時間活性化した。他の場合では、Ｔ細胞を刺激することなく染色した。分泌されたタンパク質の検出のために、Ｔ細胞をＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞10^6個当たり２５μｌ）（ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ）で２４時間刺激し、タンパク質輸送阻害剤ブレフェルジンＡ（５μｇ　ｍｌ$^{-1}$）及びモネンシン（２μＭ）を刺激（ＩＬ１２Ｂ、ＬＴＡ、ＬＩＧＨＴ）の最後の６時間に含めた。

【０１９０】

最初に、細胞を収集し、Ｄ－ＰＢＳで洗浄し、暗所の室温で、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ　Ｖｉｏｌｅｔ細胞生存率色素で５分間染色し、続いて、氷上で２０分間表面抗体染色した。表面抗体染色後（適用可能な場合）、細胞をＰＢＳで洗浄し、Ｓｏｎｙ　ＳＨ８００Ｓ細胞ソーターで取得するか、又は細胞内染色のために採取した。細胞内染色のために、細胞を適切な固定緩衝液に再懸濁させた。以下の固定緩衝液を、特定のタンパク質検出に使用した：ＩＬ１２Ｂ及びＭＳ４Ａ３染色用のＦｉｘａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）；ＢＡＴＦ、ＴＣＦ１、及びＦＬＡＧ染色用のＴｒｕｅ－Ｎｕｃｌｅａｒ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｆｉｘ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）；並びにＫｉ－６７用のＦｏｘＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　ＦｉｘａｔｉｏｎＲｅａｇｅｎｔ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。固定緩衝液中での再懸濁後、細胞を暗所で、室温で１時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を適切な透過緩衝液で２回洗浄した。以下の透過緩衝液を使用した：ＩＬ１２Ｂ及びＭＳ４Ａ３染色用のＩｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ　Ｗａｓｈ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）；ＢＡＴＦ、ＴＣＦ１及びＦＬＡＧ染色用のＴｒｕｅ－Ｎｕｃｌｅａｒ　Ｐｅｒｍ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）；並びにＫｉ－６７用のＦｏｘＰ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。透過化後、細胞を、暗所、室温で３０分間、特異的抗体又はアイソタイプ対照で染色した。最後に、細胞を適切な透過化緩衝液で２回洗浄し、Ｓｏｎｙ　ＳＨ８００Ｓフローサイトメータで取得した。細胞周期分析のために、細胞を取得直前に０．５μｇ　ｍｌ$^{-1}$７－ＡＡＤで５分間更に染色した。ゲーティングは、適切なアイソタイプ、蛍光マイナス１、及び生物学的対照を使用して行った。典型的には、試料毎に５，０００～１０，０００のライブイベントを記録した。

【０１９１】

リン酸化タンパク質のフローサイトメトリー検出

Ｔ細胞をＩＬ－２無添加でＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ－ＸＦ　Ｔ細胞拡張培地中で２４時間静置した後、リン酸化タンパク質を検出した。休止細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（

細胞10^6個当たり２５μｌ）で、対応する図に示される時間刺激した。刺激期間後直ちに、細胞を１：１の体積比の予め温めたＦｉｘａｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で、３７℃で１５分間固定し、細胞染色緩衝液（Ｄ－ＰＢＳ＋２％ＦＢＳ）で２回洗浄した。製造業者のプロトコルに従って、細胞を残留体積に再懸濁させ、ボルテックスしながら予め冷却した１ｍｌのＴｒｕｅ－Ｐｈｏｓ Ｐｅｒｍ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）中で透過処理した。細胞をＴｒｕｅ－Ｐｈｏｓ Ｐｅｒｍ Ｂｕｆｆｅｒ中で、－２０℃で６０分間インキュベートした。透過処理後、細胞を細胞染色緩衝液で２回洗浄し、抗ＣＤ４、抗ＣＤ８、抗ＲＥＬＡ、及び抗ホスホ－ＲＥＬＡ抗体（又はアイソタイプ対照）を用いて室温で３０分間染色した。染色後、細胞を細胞染色緩衝液中で２回洗浄し、Ｓｏｎｙ ＳＨ８００Ｓ細胞ソーターで取得した。ゲーティングを$CD4^+$又は$CD8^+$細胞で行い、ＲＥＬＡ及びホスホ－ＲＥＬＡのレベルを、適切なアイソタイプ及び生物学的対照を使用して決定した。

【０１９２】

タンパク質及びリン酸化タンパク質のウェスタンブロット検出

ｔＮＧＦＲ又はＬＴＢＲを発現し、休止しているか、又はＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞10^6個当たり２５μｌ）で１５分間刺激したＴ細胞を収集し、１×Ｄ－ＰＢＳで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｂｉｍａｋｅ Ｂ１４００１）及びホスファターゼ阻害剤カクテル（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ５８７２Ｓ）の存在下、氷上で１時間、ＴＮＥ緩衝液（１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１％のＮｏｎｉｄｅｔ Ｐ－４０）で溶解した。細胞溶解物を１０，０００ｇで１０分間スピンさせ、タンパク質濃度をＢＣＡアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で決定した。等量の細胞溶解物（２５ｍｇ）を、Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ ＳＤＳ試料緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で変性させ、Ｎｏｖｅｘ４－１２又は４－２０％Ｔｒｉｓ－グリシンゲル（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にロードした。ＰａｇｅＲｕｌｅｒ染色前タンパク質ラダー（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、タンパク質サイズを決定した。ゲルを、１２０Ｖで約１２０分間、１×Ｔｒｉｓ－グリシン－ＳＤＳ緩衝液（ＩＢＩ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中でランさせた。タンパク質を、２０％のメタノールを補充した、予め冷却された１×Ｔｒｉｓ－グリシン移動緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の存在下のニトロセルロース膜（ＢｉｏＲａｄ）上で、１００Ｖで１００分間移動させた。

【０１９３】

免疫ブロットを、１％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳＴ）を添加した１×ＰＢＳに溶解した５％脱脂乳でブロックし、以下の一次抗体：ウサギ抗ＧＡＰＤＨ（０．１ｍｇ ml^{-1}，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，２１１８Ｓ）、マウス抗ＩＫＫα（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，３Ｇ１２）、ウサギ抗ＩＫＫβ（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｄ３０Ｃ６）、ウサギ抗ＮＦ－κＢ ｐ６５（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｄ１４Ｅ１２）、ウサギ抗ホスホ－ＮＦ－κＢ ｐ６５ Ｓｅｒ５３６（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，９３Ｈ１）、マウス抗ＩκＢα（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｌ３５Ａ５）、ウサギ抗ホスホ－ＩκＢα Ｓｅｒ３２（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，１４Ｄ４）、ウサギ抗ＮＦ－κＢ ｐ１００／ｐ５２（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，４８８２）、及びウサギ抗ＲＥＬＢ（１：１，０００希釈，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｃ１Ｅ４）を別々に用いて４℃で一晩インキュベートした。一次抗体の後、ブロットを、ＩＲＤｙｅ ６８０ＲＤロバ抗ウサギ（０．２ｍｇ ml^{-1}，ＬＩ－ＣＯＲ ９２６－６８０７３）又はＩＲＤｙｅ ８００ＣＷロバ抗マウス（０．２ｍｇ ml^{-1}，ＬＩ－ＣＯＲ ９２６－３２２１２）とともにインキュベートした。ブロットをＯｄｙｓｓｅｙ ＣＬｘ（ＬＩ－ＣＯＲ）を使用して画像化し、ＩｍａｇｅＪ ｖ．１．５２を使用して定量した。

【０１９４】

サイトカイン分泌の定量化

分泌されたＩＦＮγ及びＩＬ－２の測定のために、Ｔ細胞を最初に収集し、ＩＬ－２無添加の培地中で２４時間休止させた。次いで、それらを計数し、丸底９６ウェルプレートにウェル当たり細胞２．５×１０^{4}個で播種し、ＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞１０^{6}個当たり２５μｌ）の添加又は無添加で、ＩＬ－２無添加の培地で２４時間インキュベートした。次に、細胞上清を回収し、希釈し、Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｆ２００　Ｐｒｏ（Ｔｅｃａｎ）プレートリーダーを使用して、酵素結合免疫吸着アッセイ（ヒトＩＬ－２又はＩＦＮγ　ＤｕｏＳｅｔ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いたサイトカイン定量に使用した。休止しているか又は刺激したＴ細胞において分泌されたサイトカイン及びケモカインの多重定量化を、ヒトサイトカイン／ケモカイン４８－Ｐｌｅｘ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ａｓｓａｙ　Ａｒｒａｙ（Ｅｖｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して行った。

【０１９５】

Ｔ細胞殺滅アッセイ

ＣＤ１９$^{+}$Ｎａｌｍ６細胞に、ＥＧＦＰｄ２ＰＥＳＴ－ＮＬＳをコードするレンチウイルスベクター及びピューロマイシン耐性遺伝子を最初に形質導入した[53]。形質導入した細胞は、安定的なＥＧＦＰ発現を維持するために、培養を通してピューロマイシン選択で保持され、ピューロマイシンは、殺滅アッセイの前に培地からのみ除去された。Ｔ細胞を、ＣＤ２８ストーク、ＣＤ２８膜貫通、及びＣＤ２８シグナル伝達ドメイン、又はＣＤ８ストーク及び４－１ＢＢシグナル伝達ドメインを有するＣＤ８膜貫通ドメインのいずれか、並びにＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを使用して、ＣＤ１９に特異的なＣＡＲをコードするベクターで形質導入した[54]。形質導入の１４日後、形質導入したＴ細胞を、０．０１％ポリ－ｌ－オルニチン（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）で予めコーティングした平底９６ウェルプレートにおいて、５×１０^{4}個のＮａｌｍ６　ＧＦＰ$^{+}$細胞と、指示されたエフェクター：標的比で、三重測定でＩＬ－２無添加のＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ培地中で混合した。次いで、ウェルを、２０×拡大を使用して、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ　ＳＸ１を使用して撮像し、最大１２０時間、２時間毎にウェル当たり４枚の画像を取得した。各ウェルについて、組み込まれたＧＦＰ強度を２時間の時点に対して正規化し、細胞を播種した後に完全に沈降させた。

【０１９６】

インビトロｍＲＮＡ調製

インビトロ転写のための鋳型は、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲをコードするプラスミドからＰＣＲによって生成され、もたらされるアンプリコンは、ＯＲＦの上流のＴ７プロモーターを含んだ。次いで、精製された鋳型を、ＨｉＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｍＲＮＡ　Ｋｉｔ　ｗｉｔｈ　Ｃａｐｐｉｎｇ（ＮＥＢ）を使用して、キャッピング及びポリＡテーリングを用いてインビトロ転写に使用した。

【０１９７】

初代Ｔ細胞ヌクレオフェクション

活性化したＴ細胞を、活性化の２４時間後にインビトロ転写したｍＲＮＡで、又は活性化の４８時間後にＣａｓ９タンパク質でヌクレオフェクションした。細胞を収集し、ＰＢＳで２回洗浄し、２０μｌ当たり細胞５×１０^{5}個でＰ３　Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｃｅｌｌ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｌｏｎｚａ）中に再懸濁させた。再懸濁後直ちに、１μｇのｍＲＮＡ又は１０μｇのＣａｓ９（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）を添加し（反応物の１０％ｖ／ｖを超えない）、細胞を４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ）でＥ０－１１５プログラムを使用してヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション後、細胞をＩＬ－２とともに予め温めたＩｍｍｕｎｏｃｕｌｔ培地中に再懸濁させ、５％ＣＯ２とともに３７℃で２０分間回収した。回収後、細胞を１ｍｌ当たり細胞１×１０^{6}個で播種し、下流アッセイに使用した。

【０１９８】

ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑ試料調製及び配列決定

単一細胞配列決定では、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をＯＲＦで個々に形質導入し、別々に、ピュー

ロマイシン選択下で１４日間保持した。次に、形質導入した細胞を組み合わせ、２つの条件に分け、一方はＩＬ－２の存在下でのみ２４時間培養し、他方は細胞10^6個当たり６．２５μｌのＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤を更に補充した。刺激後、細胞を収集し、計数し、染色緩衝液（ＰＢＳ中の２％ＢＳＡ＋０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０）に１ｍｌ当たり細胞2×10^7個で再懸濁させた。次に、１０％（ｖ／ｖ）のＨｕｍａｎ　ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ　Ｆｃ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を添加し、細胞を４℃で１０分間インキュベートした。Ｆｃ受容体ブロッキング後、細胞濃度を１ｍｌ当たり細胞5×10^6個に調整し、刺激した細胞及び非刺激細胞を各々４つの条件に分けた。各条件は、同じ１０×Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｃｈｒｏｍｉｕｍレーンにおいて異なる状態のプールを可能にするために、異なるオリゴヌクレオチド－コンジュゲート化（バーコード化）細胞ハッシング抗体を受けた[23]。氷上での２０分間共インキュベーション後、細胞を染色緩衝液で３回洗浄し、トリパンブルー除外を使用して計数した。細胞生存率は、典型的にはおよそ９５％だった。

【０１９９】

次に、異なるハッシング抗体で染色した細胞を等しい数で一緒にプールし、細胞表面抗原の定量化のために以下のオリゴヌクレオチド－コンジュゲート化（バーコード化）抗体で染色した：ＣＤ１１ｃ（０．１μｇ）、ＣＤ１４（０．２μｇ）、ＣＤ１６（０．１μｇ）、ＣＤ１９（０．１μｇ）、ＣＤ５６（０．２μｇ）、ＣＤ３（０．２μｇ）、ＣＤ４５（０．０１μｇ）、ＣＤ４５ＲＡ（０．２μｇ）、ＣＤ４５ＲＯ（０．２μｇ）、ＣＤ４（０．１μｇ）、ＣＤ８（０．１μｇ）、ＣＤ２５（０．２５μｇ）、ＣＤ６９（０．２５μｇ）、及びＮＧＦＲ（０．２５μｇ）（ＴｏｔａｌＳｅｑ－Ｃ，Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）。細胞を氷上で３０分間染色し、染色緩衝液で３回洗浄し、ＰＢＳ中に再懸濁させ、４０μｍ細胞ストレーナーに通して濾過した。次いで、細胞を計数し、濃度を1×10^6個 ml^{-1}に調整した。１０×Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｃｈｒｏｍｉｕｍにロードするために、細胞3×10^4個を、逆転写段階でＯＲＦ転写捕捉を促進するために、ピューロマイシン耐性カセットに結合するカスタムリバースプライマーを補充したＣｈｒｏｍｉｕｍ　Ｎｅｘｔ　ＧＥＭ　Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｅｌｌ　５　’ｖ２　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（１０×Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）と組み合わせた。カスタムリバースプライマーを、マスターミックスに含まれるポリ－ｄＴプライマーに対して１：３比で添加した。

【０２００】

ｃＤＮＡ増幅のために、試料ハッシング及び表面抗原バーコードの増幅のための付加的プライマー[23]、並びにＯＲＦの下流のピューロマイシン耐性カセットに結合するネステッドリバースプライマーを含んだ。ｃＤＮＡ増幅後、ＳＰＲＩビーズを、もたらされるＰＣＲ産物のサイズ選択：小サイズ（３００ｂｐ未満）に使用し、試料ハッシング及び表面抗原バーコードを、下流処理のために、より大きなｃＤＮＡ及びＯＲＦアンプリコンから物理的に分離した。試料ハッシング及び表面抗原バーコードも処理した[22]。次いで、増幅されたｃＤＮＡを、遺伝子発現ライブラリ、αβＴＣＲライブラリ、及びＯＲＦライブラリの構築のために、３つの条件に分けた。ＯＲＦライブラリを、ＯＲＦの下流に結合するネステッドリバースプライマーを使用して、αβＴＣＲライブラリと同様に処理した。生成したライブラリの品質は、高感度ＤＮＡキット（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用してＢｉｏＡｎａｌｙｚｅｒで検証した。ライブラリは、ＮｅｘｔＳｅｑ５００で配列決定した。遺伝子発現ライブラリでは、細胞当たり２５，０００リード超が生成された。他のライブラリでは、細胞当たり５，０００リード超が生成された。

【０２０１】

ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑデータ分析

１０×Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｃｅｌｌ　Ｒａｎｇｅｒ３．１．０を使用して、遺伝子発現独自の分子識別子（ＵＭＩ）カウントマトリックス及びＴＣＲクロノタイプを誘導した。ハッシュタグオリゴ（ＨＴＯ）及び抗体ＵＭＩカウントマトリックスは、カリスト（ｋａｌｌｉｓｔｏ）ｖ．０．４６．０[55]及びバスツール（ｂｕｓｔｏｏｌ）ｖ．０．３９．３[56]を使用して生成した。ＯＲＦリードは、Ｂｏｗｔｉｅ２　ｖ．２．２．８[57]を使

用して最初にプラスミド参照に整列させ、関連するＯＲＦにインデックス付けし、その後、カリスト及びバスツールを使用してＵＭＩカウントマトリックスを生成した。全てのモダリティは、中心対数比（ＣＬＲ）変換を使用して正規化した。細胞ダブレット及び陰性を、ＨＴＯＤｅｍｕｘ[58]機能を使用して特定し、次いで、下流分析から除外した。ＨＴＯＤｅｍｕｘにおけるＵＭＩカットオフ分位数は、０～１の値を有するグリッドサーチを使用してシングレット回収を最大化するように最適化された。ＯＲＦシングレットを、ＭＵＬＴＩｓｅｑＤｅｍｕｘ[59]を使用して特定した。次いで、低品質の遺伝子発現メトリックスを有する細胞を除外し、２００個未満の独自のＲＮＡ特徴又はミトコンドリアトランスクリプトームにマッピングしている５％超のリードを有する細胞を除外した。

【０２０２】

次いで、カウントマトリックスをＳｅｕｒａｔ　ｖ．４．０．１[60]にロードし、それを用いて分析した。デフォルト遺伝子を用いたＣｅｌｌＣｙｃｌｅＳｃｏｒｉｎｇ関数を使用して、遺伝子発現データの細胞周期補正及びスケーリングを行い、続いてＳｃａｌｅＤａｔａ関数を使用してデータをスケーリングした。次に、スケーリング及び補正したデータの主成分（ＰＣ）最適化を、ＪａｃｋＳｔｒａｗ[61]を使用して行い、クラスタリングに使用する最初の有意でないＰＣまでの全てのＰＣを選択した。細胞のクラスタリングは、共有最近傍（ＳＮＮ）ベースのクラスタリングアルゴリズムを使用して行われ、ＵＭＡＰ次元縮小[62]を使用して視覚化されて、クラスターＰＣを２Ｄ空間に投影した。クラスターマーカー分析は、クラスター細胞の少なくとも２５％に存在する陽性及び陰性マーカーとして定義された仮説セット、及び非クラスター細胞と比較して０．２５の$\log_2$変換した倍率変化閾値を用いて、ＦｉｎｄＡｌｌＭａｒｋｅｒｓ関数を使用して行われた。ＯＲＦの差次的発現分析は、ＤＥＳｅｑ２[50]を使用して行い、ＮＧＦＲ（対照）細胞と比較して、ＯＲＦ発現細胞において上方及び下方調節された遺伝子を特定し、差次的発現は、Ｓｔｏｒｅｙ方法[63]を使用して計算されたｑ＜０．１を有するものとして定義された。

【０２０３】

バルクＲＮＡ－ｓｅｑ及び分析

ＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$ＬＴＢＲ形質導入Ｔ細胞又はｔＮＧＦＲ形質導入Ｔ細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞10^6個当たり２５μｌ）で２４時間刺激するか、又は非刺激のままにした（ｎ＝３の生物学的反復）。全ＲＮＡは、Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ精製キット（Ｚｙｍｏ）を使用して抽出した。３’濃縮ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリを、以前に報告されているように調製した[64]。簡単に説明すると、ＲＮＡは、ＳＭＡＲＴＳｃｒｉｂｅ逆転写酵素（Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ）及び部分的なＮｅｘｔｅｒａハンドルを含有するポリ（ｄＴ）オリゴを使用して逆転写した。次いで、もたらされるｃＤＮＡを、ＯｎｅＴａｑポリメラーゼ（ＮＥＢ）を使用して３サイクルでＰＣＲ増幅させ、自家製トランスポザーゼＴｎＹを使用して、５５℃で５分間タグ付けした[44]。直後に、タグ付けしたＤＮＡをＭｉｎＥｌｕｔｅカラム（Ｑｉａｇｅｎ）で精製し、ＯｎｅＴａｑポリメラーゼ及びバーコード化プライマーを使用して１２サイクルにわたってＰＣＲ増幅させた。ＰＣＲ産物を、デュアル（０．５×～０．８×）ＳＰＲＩクリーンアップ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ）を使用して精製し、Ｔａｐｅｓｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用してサイズ分布を決定した。試料をｖ２．５　７５サイクルキット（ペアードエンド）を使用して、ＮｅｘｔＳｅｑ　５００（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）で配列決定した。ペアードエンドリードをカリストｖ．０．４６．０[55]を使用してトランスクリプトーム（ヒトＥｎｓｅｍｂｌ　ｖ．９６参照[65]）に整列させ、ｔｘｉｍｐｏｒｔパッケージ[66]を使用してＲ　４．０．０．２を備えたＲＳｔｕｄｉｏ１．１．４１９にロードした。ＤＥＳｅｑ２[50]を使用して、差次的遺伝子発現分析を行った。ＤＥＳｅｑ２基準（$\log_2$－変換倍率変化＞１、Ｐａｄｊ＜０．０５）に適合している遺伝子のＧＯ濃縮（生物学的プロセス）を、ｔｏｐＧＯパッケージ[51]を使用して行った。

【０２０４】

ＡＴＡＣ－ｓｅｑライブラリの調製

ＣＤ８$^{+}$ＬＴＢＲ　Ｔ細胞及びｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞を、ＣＤ３／ＣＤ２８活性化剤（細胞１０^{6}個当たり２５μｌ）で２４時間刺激するか、又は非刺激のままにした（ｎ＝２の生物学的反復）。バルクＡＴＡＣ－ｓｅｑを既に報告されているように行った[44]。簡単に説明すると、細胞膜を、０．１％ＩＧＥＰＡＬを添加したばかりのＲＳＢ緩衝液（１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣＬ，ｐＨ７．４、３ｍＭのＭｇＣｌ$_{2}$、１０ｍＭのＮａＣｌ）に溶解させた。上下にピペッティングした後、核を、５００ｇで、４℃で５分間遠心分離することによって単離した。上清を廃棄した後、自家製トランスポザーゼＴｎＹタンパク質[44]を添加したＴａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ＤＮＡ（ＴＤ）緩衝液[44]に核を再懸濁させ、３７℃で３０分間インキュベートした。ＭｉｎＥｌｕｔｅカラム（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した後、タグ付けしたＤＮＡを、自家製のＰｆｕ　Ｘ７　ＤＮＡポリメラーゼ[44]及びバーコード化プライマーを１２サイクルで使用してＰＣＲ増幅させた。ＰＣＲ産物は、１．５×ＳＰＲＩクリーンアップ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ）を介して精製し、ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して特徴的なヌクレオソームバンディングパターンについて確認した。試料をｖ２．５　７５サイクルキット（シングルエンド）を使用して、ＮｅｘｔＳｅｑ５００（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）で配列決定した。

【０２０５】

ＡＴＡＣ－ｓｅｑ分析

シングルエンドリードをＢｏｗｔｉｅ２　ｖ．２．４．４[57]を使用してＧｅｎｃｏｄｅ　ｈｇ３８プライマリアセンブリ[67]に整列させた。次に、ＳＡＭｔｏｏｌｓ　ｖ．１．９[68]を使用して、低マッピング品質（ＭＡＰＱ＜３０）でアライメントをフィルタリングし、続いてフィルタリングしたＢＡＭファイル[68]をソート及びインデックス化した。リード重複は、Ｐｉｃａｒｄ　ｖ．４．１．８．１[69]を使用して取り除いた。ピークは、デフォルトパラメータ（－ｇ２．７ｅ９　－ｑ０．０５）を用いたＭＡＣＳ３　ｖ．３．０．０[70]を使用して呼び出した。

【０２０６】

下流分析の多くに使用されるユニオン特徴空間（「ユニオンピーク」）を構築するために、ＢＥＤＴｏｏｌｓ　ｖ．２．２９．０（ベッドツールインターセクト（ｂｅｄｔｏｏｌｓ　ｉｎｔｅｒｓｅｃｔ）を使用）を使用して、生物学的複製のｎａｒｒｏｗＰｅａｋファイルのペアで交差を行い、両方の複製[71]に認められたこれらのピークのみを保持した。複製物間の共有ピークをマーキングした後、ベッドツールマージ（ｂｅｄｔｏｏｌｓ　ｍｅｒｇｅ）を使用して各共有ピーク（少なくとも１ｂｐのオーバーラップ）における生物学的複製物を統合した。この新しいピークＢＥＤファイルでは、各共有ピークは、生物学的複製のいずれかでピークの下に見出される全ての配列を含む。次に、これらのピークファイル（ＬＴＢＲ休止、ＬＴＢＲ刺激、ｔＮＧＦＲ休止、ｔＮＧＦＲ刺激）の各々のユニオンを得、少なくとも１ｂｐオーバーラップを有する任意のピークを組み合わせた。ユニオンピークを使用して、ピークリードカウントマトリックス（ユニオンピーク×ＡＴＡＣ試料）を生成し、マトリックス内の各エントリーは、指定された試料内のそのピークとオーバーラップするリード数－これをピーク毎のＡＴＡＣマトリックスと呼ぶ－に対応する。オーバーラップするリードは、各試料についてアライメントを提供するＢＡＭファイル（ＢＥＤに変換）から直接得られる。そのため、マトリックスは、各生物学的複製物に関する列を含む。試料は、整列したリードにおいて最小の差を有したが、各試料におけるＴＳＳ領域とオーバーラップしたリードの数によって、マトリックス内の各エントリーを正規化した。この手段では、試料間のリード又はアライメント深度における任意の差は、適切に正規化される。ピーク毎のＡＴＡＣマトリックスに加えて、遺伝子毎のＡＴＡＣマトリックスも以下のように構築した：遺伝子の開始座標又は終了座標の３ｋｂ以内の全てのピークについて、ピーク毎のＡＴＡＣマトリックスから正規化したリードの合計として、遺伝子の全ＡＴＡＣリードを割り当てた。

【０２０７】

ＤＥＳｅｑ２　ｖ．１．３２．０を使用した遺伝子及びピーク濃縮分析のために、これら２つのＡＴＡＣマトリックス（ピーク毎及び遺伝子毎）をＲ　ｖ．４．１．１に取り込

んだ。ＡＴＡＣ－ｓｅｑとＲＮＡ－ｓｅｑとの間の比較のために、調整したＰ値＜０．０５の統計的閾値、及びｌｏｇ$_2$－形質転換倍率変化＞０（ＡＴＡＣ又はＲＮＡにおける増加）又はｌｏｇ$_2$－形質変換倍率変化＜０（ＡＴＡＣ又はＲＮＡにおける減少）のいずれかを使用した。転写因子－モチーフ分析では、以下のようにＣｈｒｏｍ－ＶＡＲ　ｖ．１．１４．０７２を使用した：試験条件対対照条件の各々について、ピーク毎のマトリックスの列及び試料サブセット並びにユニオン特徴空間を使用して、Ｓｕｍｍａｒｉｚｅｄ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ　ｏｂｊｅｃｔｓを構築した。ｍａｔｃｈＭｏｔｉｆｓ関数を使用して、転写因子モチーフを注釈した。ｃｏｍｐｕｔｅＤｅｖｉａｔｉｏｎｓ関数を使用して、試験条件と対照条件の間の濃縮偏差を計算した。

【０２０８】

特定のゲノム遺伝子座でリードパイルアップトラックを生成するために、サムツールマージ（ｓａｍｔｏｏｌｓ　ｍｅｒｇｅ）を使用して、生物学的複製物（ＢＡＭ）から重複排除されたリードをプールした。ディープツール（ｄｅｅｐｔｏｏｌ）ｖ．３．４．２からのｂａｍＣｏｖｅｒａｇｅ関数を使用することによって、これらのプールした複製ＢＡＭファイルをｂｉｇＷｉｇファイルに変換し、ｓｃａｌｅＦａｃｔｏｒを他の全ての試料集団と比較したプールした生物学的複製に見出されたＴＳＳの相対数に設定した７３。ｂｉｇＷｉｇファイルを使用して、ｐｙＧｅｎｏｍｅＴｒａｃｋｓ　ｖ．３．６[74]を用いてリードパイルアップをプロットした。

【０２０９】

最後に、増加したクロマチンアクセシビリティを有する遺伝子近くのＡＴＡＣピークでｋ平均クラスター化を行った。最初に、遺伝子毎のＡＴＡＣマトリックスでＤＥｓｅｑ２を使用して、ｌｏｇ$_2$－形質転換倍率変化＞１及び調整したＰ値＜０．０５（すなわち、増加したクロマチンアクセシビリティを有する遺伝子）を有する遺伝子を、２つの比較：（１）ＬＴＢＲ刺激対ｔＮＧＦＲ刺激、（２）ＬＴＢＲ休止対ｔＮＧＦＲ休止、のいずれかで特定した。これらの遺伝子を特定した後、遺伝子本体の３ｋｂ以内にピーク毎のＡＴＡＣマトリックス内の全てのアクセシビリティピークを単離し、ピーク毎のＡＴＡＣマトリックスからのこのサブセットのピークを、クラスタリングのための入力として使用した。次に、このＡＴＡＣピークのサブセットでディープツール（ｃｏｍｐｕｔｅＭａｔｒｉｘ及びｐｌｏｔＨｅａｔｍａｐ関数）を使用して、ｋ＝４クラスター及び６ｋｂリードウィンドウを用いてｋ平均クラスタリングを行った。

【０２１０】

統計分析

２つの群間のデータは、データのタイプに適するように（分布の正規性に応じて）、両側対応なしスチューデントｔ検定又はマンホイットニー検定を使用して比較した。別段の指示がない限り、０．０５以下のＰ値は、全ての分析について統計的に有意であるとみなされ、多重比較のために補正されなかった。多重比較補正が必要な場合には、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ方法を使用してＰ値を調整した。別段の記載がない場合、全ての群の結果は、平均値±ｓ．ｅ．ｍとして表される。統計分析は、Ｐｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ）及びＲＳｔｕｄｉｏ（Ｒｓｔｕｄｉｏ　ＰＢＣ）で行った。フローサイトメトリーデータは、ＦｌｏｗＪｏ　ｖ．１０．７．１（Ｔｒｅｅｓｔａｒ）を使用して分析した。

【０２１１】

実施例２

Ｔ細胞増殖の合成ドライバーのためのゲノムスケールスクリーニング

バーコード化ヒトＯＲＦのレンチウイルスライブラリを使用して、初代ヒトＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞においてゲノムスケール機能獲得スクリーニングを行った。最も強い増殖表現型を有するＴ細胞が、免疫応答の既知及び未知の調節因子の両方について濃縮されており、その多くが典型的には末梢Ｔ細胞によって発現されないことを示す。スクリーニングに無関係なドナーからの細胞におけるトップランクのＯＲＦを検証し、これらのＯＲＦが、Ｔ細胞増殖を駆動するだけでなく、活性化マーカーの発現及び主要な炎症誘発性サ

イトカインの分泌を増加させることを更に実証する。これらの遺伝子の作用機序についてより包括的な洞察を得るために、直接的なＯＲＦ捕捉と相まって単一細胞配列決定アプローチを開発する。ＬＴＢＲ－リンパ球によって発現されないトップランクのＯＲＦのうちの１つ－を、増加したＮＦ－κＢシグナル伝達を介した重大な転写的及びエピジェネティックなリモデリングの主要なドライバーとして特定し、これは炎症誘発性サイトカインの分泌及びアポトーシスに対する耐性の著しい増加をもたらす。最後に、トップランクのＯＲＦが、ＣＤ１９指向性ＣＡＲ　Ｔ細胞、並びに健常なドナー及び血液がんを有する患者からの広範囲な腫瘍反応性γδＴ細胞の文脈において、抗原特異的Ｔ細胞機能を増強することを示す。

【０２１２】

Ｔ細胞におけるゲノムスケールのＯＲＦスクリーニング

大型細菌タンパク質の構成的発現又は標的遺伝子の近傍におけるクロマチンアクセシビリティに依存することを避けるために[13]、ヒトＯＲＦのレンチウイルスライブラリを使用することを決定し、このライブラリは、ほぼ１２，０００個の全長遺伝子を含有し、遺伝子当たりおよそ６個のバーコードを有する[14]（図１Ａ、図６Ａ～図６Ｆ）。これまで、ヒトＴ細胞におけるゲノムスケールの機能喪失スクリーニングは、ＣＤ４$^+$又はＣＤ８$^+$Ｔ細胞のいずれかに焦点を当ててきている。しかしながら、ＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞の両方とも、養子療法における持続的な腫瘍制御のために必要とされており[15、16]、定義された１：１のＣＤ４$^+$とＣＤ８$^+$の比を有する抗ＣＤ１９　ＣＡＲ　Ｔ細胞のＦＤＡ承認によって更に例示される通りである[1]。したがって、ＯＲＦライブラリを使用して、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）刺激に応答してＣＤ４$^+$及びＣＤ８＋Ｔ細胞の両方の増殖を促進する遺伝子を発見することを決定した（図１Ａ、図６Ｇ～図６Ｉ）。

【０２１３】

レンチウイルスＯＲＦライブラリを３名の健常なドナーからのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞に形質導入し、培養の短期間（１４日）後に細胞を再刺激して、ＴＣＲ刺激に応答した増殖のドライバーを特定した。個々のＯＲＦバーコードの大部分、及び最大のものを含むほぼ全てのＯＲＦを捕捉することができた（図６Ｊ）。最も高い増殖性細胞における遺伝子の相対的頻度を未選別の細胞と比較して、トップランクのＯＲＦの中でも免疫プロセスに関与することが知られている遺伝子の濃縮を見出した（図６Ｋ）。Ｔ細胞機能の重要なメディエーターであるＭＡＰＫ３（ＥＲＫ１をコードする）[17]、共刺激分子ＣＤ５９[18]、転写因子ＢＡＴＦ、並びにＩＬ１２Ｂ及びＩＬ２３Ａなどの Ｔ細胞増殖を促進することが知られているサイトカイン[19]を特定した。実際、最近の２つの試験は、ＩＬ１２Ｂ及びＢＡＴＦの過剰発現が、ＣＡＲ　Ｔ細胞における増殖、細胞傷害性、及びサイトカイン分泌を促進することを示した[19、20]。

【０２１４】

ライブラリ中の各ＯＲＦは、平均６個のＤＮＡバーコードに連結させる（図６Ｂ）。プールしたスクリーニングからの本発明者らのトップランクのＯＲＦへの信頼性を高めるために、増殖するＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$細胞における所与のＯＲＦに対応する個々のバーコードの濃縮を評価した（図６Ｂ、図６Ｃ）。大部分のＯＲＦでは、各遺伝子における複数の個々のバーコードが高度に増殖している集団で濃縮されたため、観察された濃縮が偽クローンの増殖又はＰＣＲバイアスから生じないことを示唆している。驚くべきことに、最も著しくに濃縮された遺伝子は、リンホトキシン－β受容体（ＬＴＢＲ）であり、間質細胞及び骨髄細胞で広く発現されるが、リンパ球には完全に存在しない遺伝子である。

【０２１５】

全体として、濃縮されたＯＲＦは、多様な生物学的プロセスにまたがっていた。最上位濃縮された遺伝子オントロジー（ＧＯ）生物学的プロセスのなかでも、リンパ球増殖、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）産生、及びＮＦ－κＢシグナル伝達（図６Ｌ）だった。濃縮されたＯＲＦが、ＣＤ３及びＣＤ２８（ＣＤ３／ＣＤ２８）による刺激中にＴ細胞によって内因的に上方調節された遺伝子にわずかだけ優先を示し、実際には、全てのクラスの差異的発現において示されたことを観察した（図６Ｍ）。この結果は、Ｔ細胞増殖を可能

にするが、ＣＤ３／ＣＤ２８媒介性活性化及び増殖中に正常に発現されない遺伝子を発見するためのプールしたＯＲＦスクリーニングの能力を強調する。その後の検証のために、Ｔ細胞適合性に関連する多様な経路で機能し、異なる内因性調節モードを示した広範なＯＲＦを試験することを決定した。中立遺伝子（ＭＨＣ－Ｉ複合体及び細胞型特異的分化マーカー）を比較のために含める。遺伝子は、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激Ｔ細胞及び休止Ｔ細胞における差次的発現に基づいて特定された（上方調節された：ＩＬ１ＲＮ、ＮＦＹＢ、ＢＡＴＦ、ＡＨＮＡＫ、ＣＬＩＣ１、ＲＡＮ、ＤＢＩ、ＧＰＤ１、ＧＰＮ３、ＡＨＣＹ、ＨＯＭＥＲ１、ＭＲＰＬ１８、ＭＲＰＬ５１、ＬＩＧ３、ＺＮＦ８３０、ＨＬＡ－Ａ；下方調節された：ＦＯＳＢ、ＡＴＦ６Ｂ、ＳＬＣ１０Ａ７、ＣＤＫ２、ＡＤＡ、ＣＤ１９；変化なし：ＣＤＫ１、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、Ｂ２Ｍ；発現なし：ＩＦＮＬ２、ＬＴＢＲ、ＣＸＣＬ１２、ＣＲＬＦ２、ＩＬ１２Ｂ、ＣＡＬＭＬ３、ＣＹＰ２７Ａ１、ＡＫＲ１Ｃ４、ＤＵＰＤ１、ＮＧＦＲ）[41]。

【０２１６】

最上位ＯＲＦはＴ細胞機能を増強する

トップランクのＯＲＦを検証し、Ｔ細胞機能の他の関連する局面におけるそれらの効果を理解するために、ライブラリから３３個のＯＲＦを、同じプロモーターからのＰ２Ａ結合ピューロマイシン耐性遺伝子を共発現するベクターにサブクローニングした。Ｔ細胞表現型[21]に影響を及ぼさない対照として、細胞内ドメインを欠いている切断神経成長因子受容体（ｔＮＧＦＲ）を選択した。ＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$集団を、何名かのスクリーニングに無関係な健常なドナーから別々に単離し、個々のＯＲＦで形質導入した（図２Ａ）。代表的なＯＲＦにフローサイトメトリーを使用して、それらが、実験期間中、Ｔ細胞の両方のサブセットで安定的かつ均一に発現されたことを確認した（図７Ａ、図７Ｂ）。

【０２１７】

単離の１４日後、細胞を再刺激し、細胞数に相対的な増加を測定した。１６個の試験したＯＲＦが、ｔＮＧＦＲと比較して有意に細胞増殖を改善し、その増殖が、ＣＤ４$^+$細胞とＣＤ８$^+$細胞との間で良く相関していたことを見出した（Ｓｐｅａｒｍａｎのｒ＝０．６１、Ｐ＝０．００２）（図２Ｂ、図２Ｃ、図７Ｃ～図７Ｈ　）。最上位ＯＲＦがＴ細胞増殖を改善することを確立しており、次に、増加した細胞周期エントリー、活性化マーカーＩＬ２ＲＡ（ＣＤ２５）及びＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）の発現、並びにサイトカイン分泌などの他のＴ細胞表現型及び機能にも変化があるか試験した。試験したＯＲＦの大部分は、周期に差を示さなかった（図２Ｉ、図２Ｊ）が、刺激後にＴ細胞におけるＣＤ２５及びＣＤ１５４の両方のより高い発現を示し（図２Ｄ、図８Ａ）、Ｔ細胞応答の大きさを改善することにおけるそれらの効果を更に裏付けた。

【０２１８】

最後に、ＣＤ３／ＣＤ２８による再刺激後のサイトカインであるインターロイキン－２（ＩＬ－２）及びＩＦＮγの分泌を測定した（図２Ｅ、図８Ｂ～図８Ｅ）。スクリーニングは、サイトカイン分泌を調節する遺伝子を特定するように設計されていなかったが、いくつかのＯＲＦは、Ｔ細胞増殖を改善し、ＩＬ－２又はＩＦＮγ分泌を促進する両方を行うことができた（図２Ｆ）。最も強い効果がＬＴＢＲについて観察され、ＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$Ｔ細胞におけるこれらサイトカインの両方の分泌を５倍超増加させた。

【０２１９】

ＯＲＦ表現型の単一細胞分析

各ＯＲＦが増殖、活性化、及びサイトカイン放出にどのように影響するかの定量化に基づいて、次に、細胞状態におけるこれらの変化を駆動する根本的なメカニズムをよりよく理解することを試みた。個々のＯＲＦの作用機序のより包括的な見解を得るために、及びそれらが誘導する表現型変化の多次元特性評価を提供するために、直接ＯＲＦ捕捉を用いた単一細胞配列決定戦略を開発した。このアプローチであるＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑ（トランスクリプトーム及び配列決定によるエピトープの過剰発現－コンパチブル細胞インデックス化）は、表面抗原[22]及びＣＲＩＳＰＲ摂動[23]を定量化するために本発明者らが開発している以前のアプローチを拡張し、異なるＯＲＦを有するＴ細胞のプールの高ス

ループット、単一細胞分析を可能にする。簡単に説明すると、レンチウイルスによって組み込まれたＯＲＦからのｍＲＮＡは、ＯＲＦの下流の転写物の定常配列に結合するプライマーによって逆転写され、鋳型切り替え中に細胞トランスクリプトームとともにバーコード化される。次いで、遺伝子発現及びＯＲＦ発現ライブラリの別個の構築のために、もたらされたｃＤＮＡプールが分割される（図３Ａ、図３Ｂ、図９Ａ）。

【０２２０】

健常なドナーからのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に形質導入した約３０のＯＲＦのプールに、ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑを最適化して適用した。細胞プールは、非刺激のまま（「休止」）か、又はＣＤ３／ＣＤ２８抗体で刺激してＴＣＲ活性化を模倣するかのいずれかだった。ＯＲＦが各単一細胞にいかに十分に割り当てられるかの信頼性を得るために、対照遺伝子であるｔＮＧＦＲによって産生されるタンパク質が細胞表面で発現され、したがって、ＤＮＡバーコード化抗体で捕捉することができるという事実を活用した[23]。ｔＮＧＦＲ陽性として示された細胞の割合は、ＣＩＴＥ－ｓｅｑ又はフローサイトメトリーによって測定したとき、一貫していた（図３Ｃ）。ＯＲＦプール全体の分析は、所与のＯＲＦで割り当てられた単一細胞が、対応する遺伝子の最も強い発現を全体的に有したことを示し（図９Ｂ～図９Ｄ）、これは、本発明者らのＯＲＦ捕捉戦略が、各単一細胞に遺伝的摂動を確実に割り当てたことを示している。

【０２２１】

非監視クラスタリングは、刺激したＴ細胞及び休止Ｔ細胞について明確な分離を示した。これらの活性化駆動型スーパークラスター内で、細胞周期（クラスター１及び９）、巨大分子生合成（クラスター２）、Ｉ型ＩＦＮシグナル伝達（クラスター３）、細胞傷害性（クラスター６）、Ｔ細胞活性化及び増殖（クラスター１０）、並びにストレス応答及びアポトーシス（クラスター１１）などの特定の細胞状態又は機能に関連付けられた個々のクラスターを観察することができた（図３Ｄ）。多くの場合、いくつかのＯＲＦが所与のクラスター表現型に寄与したが（図９Ｅ）、クラスター１における２つのＯＲＦであるＣＤＫ１及びＣＬＩＣ１の顕著な濃縮が観察され、細胞周期の準備における染色体縮合に関与する遺伝子の増加した発現を特徴とした（図３Ｅ）。更に強い濃縮は、ＬＴＢＲを発現する細胞からほとんど排他的に構成されたクラスター１０で観察された。

【０２２２】

最も強い転写変化を伴う遺伝子摂動のメカニズムを調べるために、非刺激対照Ｔ細胞と比較したＣＤ３／ＣＤ２８刺激したＯＲＦ　Ｔ細胞の転写プロファイルを調べた（図９Ｆ～図９Ｉ）。このアプローチは、摂動間で共有されるか、又は摂動特異的である遺伝子モジュールを特定することを可能にした。例えば、ＬＴＢＲ及びＣＤＫ１は、ＲＮＡ代謝及び細胞周期（ＣＤＫ４、ＨＳＰＡ８、及びＢＴＧ３）、並びに腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）シグナル伝達経路（ＴＮＦＡＩＰ３、ＴＲＡＦ１、及びＣＤ７０）に関与する遺伝子の最も強い濃縮を示した。ＦＯＳＢは、ＴＣＲシグナル伝達（ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＬＡＰＴＭ５、及びＬＡＴ）、サイトカイン応答（ＧＡＴＡ３及びＴＮＦＲＳＦ４）、並びにＮＦ－κＢ経路（ＮＦＫＢ２、ＮＦＫＢＩＡ、及びＵＢＥ２Ｎ）に関与する遺伝子の観点から、ＬＴＢＲとは反対のプログラムを駆動するように思われた。最後に、観察された表現型は、実質的に全ての単一細胞が独自のＴＣＲクロノタイプを発現したため、単一クローンの増殖ではなく、遺伝子摂動の結果だったと決定した（図９Ｊ）。この結果は、ＯｖｅｒＣＩＴＥ－ｓｅｑのマルチモーダルキャプチャアプローチの有用性を強調し、各Ｔ細胞のトランスクリプトーム、クロノタイプ、細胞表面プロテオーム、細胞ハッシング（処理又は刺激条件のため）、及びレンチウイルスＯＲＦ同一性をもたらす。

【０２２３】

ＬＴＢＲは複数のＴ細胞機能を改善する

ＬＴＢＲは、炎症誘発性サイトカイン分泌（図２Ｅ）及び重大な転写リモデリング（図３Ｄ、図３Ｅ）の強力なドライバーとして特定されており、その作用機序をより詳細に調べることを決定した。ＬＴＢＲは、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）に属し、様々な非免疫細胞型及び骨髄起源の免疫細胞で発現されるが、リンパ球には

存在しない（図１０Ａ、図１０Ｂ）。バルクＲＮＡ配列決定（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を使用して、ＴＣＲ刺激を伴うか又は伴わずに、ＬＴＢＲ形質導入細胞とｔＮＧＦＲ形質導入細胞との間の全体的な遺伝子発現を比較した（図４Ａ、図４Ｂ、図１０Ｃ）。ＭＨＣ－Ｉ及びＩＩ遺伝子（ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、及びＨＬＡ－ＤＲＢ６）並びにＭＨＣ－ＩＩ発現に必要な転写因子（ＲＦＸ５及びＣＩＩＴＡ）の上方調節に加えて、ＬＴＢＲ細胞はまた、ＭＨＣ－ＩＩ不変鎖（ＣＤ７４によってコードされる）も発現した。特に、ＣＤ７４は、Ｂ細胞において、特に抗アポトーシス遺伝子ＴＲＡＦ１及びＢＩＲＣ３（これらの両方は、ＬＴＢＲ過剰発現細胞においても上方調節される）の上方調節を通じて、生存促進性ＮＦ－κＢ経路を活性化することが示されている[24]。同様に、ＬＴＢＲ細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の生存を促進することが示されているＢＡＴＦ３[25]を強く上方調節した。ＩＬ－２産生に関与する転写因子であるＪＵＮＢ[26]、及びＴ細胞自己再生に関与する重要な転写因子であるＴＣＦ７（ＴＣＦ１をコードする）[27]の上方調節も観察した。タンパク質レベルでのＲＮＡ－ｓｅｑ結果を確認した（図１０Ｄ～図１０Ｉ）。ＬＴＢＲ細胞はまた、活性化誘発細胞死に対してより耐性があり、反復刺激後に、より大きな機能性を保持した（図４Ｃ、図４Ｄ、図１０Ｊ～図１０Ｍ）。

【０２２４】

その内因性状況における（骨髄細胞における）ＬＴＢＲシグナル伝達は、リンホトキシン－α（ＬＴＡ）及びリンホトキシン－β（ＬＴＢ）のヘテロ三量体による、又はＬＩＧＨＴ（ＴＮＦＳＦ１４遺伝子によってコードされる）によるいずれかで誘発される。ＬＴＡ、ＬＴＢ、及びＬＩＧＨＴが活性化されたＴ細胞によって発現されるため、外因性ＬＴＡ又はＬＩＧＨＴの添加が、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激したＬＴＢＲ過剰発現Ｔ細胞のサイトカイン分泌、分化、又は増殖を調節することができるか解明することを試みたが、ＬＴＢＲ　Ｔ細胞機能に対する外因性リガンドの効果は認められなかった（図１１Ａ～図１１Ｅ）。したがって、ＬＴＢＲは、ＴＣＲ駆動Ｔ細胞応答を増強することができるが、それ自体は活性化を駆動せず、潜在的な安全性の問題となり、操作されたＴ細胞応答の抗原特異性の喪失をもたらすであろう。また、ＬＴＢＲの構成的発現は、その表現型の維持のために必要とされるが、検出可能なＬＴＢＲの発現の喪失と表現型の喪失との間にかなりの遅延時間があることが決定され（図１１Ｆ～図１１Ｉ）、ＬＴＢＲの一過性発現が、治療適用への安全な手段であり得ることを示した。

【０２２５】

最後に、Ｔ細胞において活性を駆動するＬＴＢＲタンパク質の主要ドメインを特定するために、ＬＴＢＲの一連の点又は欠失変異体を設計した（図４Ｅ、図１１Ｊ）。概して、ＬＴＢＲのＮ末端はＣ末端よりも欠失に対する感受性が低いことが見出された。同様に、ＬＴＢＲ表現型の部分的な減少は、ＬＴＡ及びＬＴＢ結合のための主要残基に３つのアラニン点変異を導入することによって[28]、又はシグナルペプチドの除去によって達成された。本発明者らのＣ末端欠失を使用して、残基３９３～４３５を欠いているＬＴＢＲの変異型は、全長ＬＴＢＲと比較して差を示さなかったが、残基３７７～４３５の欠失は、おそらくＴＲＡＦ２、ＴＲＡＦ３、又はＴＲＡＦ５に対する結合部位の喪失に起因して[29]、より高くないとしても匹敵するレベルで発現されているにもかかわらず（図１１Ｋ）、ＬＴＢＲ表現型を完全に抑止したことを見出した。更に、自己会合ドメイン[30]（３２４～３７７）の欠失もまた、表現型を完全に抑止した。

【０２２６】

ＬＴＢＲは、Ｔ細胞において標準的なＮＦ－κＢを介して作用する

ＬＴＢＲ過剰発現は、Ｔ細胞機能に変化を伴う、Ｔ細胞における広範なトランスクリプトーム変化を誘導することが示された（図４Ａ、図４Ｂ）。したがって、配列決定（ＡＴＡＣ－ｓｅｑ）によるトランスポザーゼ－アクセシブルクロマチンのアッセイを活用して、ＬＴＢＲ細胞における遺伝子発現で摂動がエピジェネティックな変化を伴ったか決定することを試みた（図１２Ａ～図１２Ｇ）。差次的にアクセシブルなクロマチン領域における特異的転写因子モチーフの濃縮を比較して、ＬＴＢＲ細胞において最も濃縮された転写因子としてＮＦ－κＢ　ｐ６５（ＲＥＬＡ）を特定した（図１２Ｈ、図１２Ｉ）。注目す

べきことに、ＮＦ－κＢ　ｐ６５及びＮＦＡＴ－ＡＰ－１は、Ｔ細胞活性化におけるそれらの十分に確立された役割に即して、刺激されたＴ細胞対休止Ｔ細胞（ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲの両方）におけるオープンクロマチンに最も濃縮された２つの転写因子であったが[31]、ＮＦ－κＢ　ｐ６５のみが、刺激の有無にかかわらず、ＬＴＢＲ細胞で強力な濃縮を示した（図４Ｆ）。この結果は、ＬＴＢＲが部分的なＴ細胞活性化状態を誘導するが、依然として完全な活性化のためにシグナル１（ＴＣＲ刺激）を必要とすることを示唆する。

【０２２７】

次に、ＮＦ－κＢシグナル伝達経路のメンバーのタンパク質発現及び／又はリン酸化における変化を調査することを決定した。ｐ６５（ＲＥＬＡ）のより迅速なリン酸化、及び分解のためにＩκＢαを標的とするＮＦ－κＢ阻害剤、ＩκＢαのリン酸化における強力な増加を観察し、これらの効果の両方が、ＮＦ－κＢ活性化又は転写を増強する（図４Ｇ、図４Ｈ、図１３Ａ～図１３Ｃ）。標準的ＮＦ－κＢ経路における変化に加えて、非標準的なＮＦ－κＢ経路の主要メディエーターであるＲＥＬＢ及びＮＦ－κＢ　ｐ５２の上方調節も検出した（図４Ｉ、図１３Ｂ、図１３Ｃ）。

【０２２８】

ＬＴＢＲが標準的及び非標準的ＮＦ－κＢ経路の両方を活性化することが確立されており、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ及びＬＴＢＲシグナル伝達経路に関与する１１個の遺伝子を標的とするＣＲＩＳＰＲ構築物の同時送達によって、ＬＴＢＲ及びＮＦ－κＢ経路の主要遺伝子を摂動させることで、この現象の分子的根拠を決定することを試みた[32]（図４Ｊ、図１３Ｄ～図１３Ｏ）。ＬＴＢ、ＴＲＡＦ２、及びＮＩＫ（ＭＡＰ３Ｋ１４としても知られる）のノックアウトは、ＬＴＢＲ細胞からのＩＦＮγの分泌を有意に減少させたが、対照（ｔＮＧＦＲ）細胞からは減少させず（又はより低い程度まで減少させ）、一方、ＬＩＧＨＴ（ＴＮＦＳＦ１４としても知られる）、ＡＳＫ１（ＭＡＰ３Ｋ５としても知られる）、及びＲＥＬＡの摂動は、ＬＴＢＲ細胞よりも対照細胞に対して強い効果を有した。ＬＴＢＲ細胞におけるＴ細胞活性化に対するＬＴＢ喪失の効果は、ＬＴＡ又はＬＴＢ結合に関与する主要残基のアラニン変異誘発（図４Ｅ）が、ＬＴＢＲ表現型を部分的に低下させたという観察を裏付ける。特に、ＴＲＡＦ２又はＴＲＡＦ３のいずれかの喪失は、優性陰性マウスであるＴＲＡＦ２からのＴ細胞がＴＣＲ刺激に応答性亢進であるという以前の結果に即して、ｔＮＧＦＲ細胞のみでＩＦＮγ分泌を促進したことが観察された[33]。

【０２２９】

ＬＴＢＲ　Ｔ細胞における標準的対非標準的ＮＦ－κＢシグナル伝達の潜在的な役割を調査するために、ＬＴＢＲ駆動遺伝子発現プロファイルに対するＲＥＬＡ又はＲＥＬＢ喪失の全体的な影響を分析することを決定した。ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲを過剰発現するＴ細胞でバルクＲＮＡ－ｓｅｑを使用して、ＲＥＬＡの喪失のみが「コア」ＬＴＢＲ遺伝子の発現を有意に下方調節したが、ＲＥＬＢの喪失は効果を有さなかったことを見出した（図４Ｋ、図１３Ｐ）。

【０２３０】

ＯＲＦは、抗原特異的応答を増強する

これまでのところ、ＯＲＦスクリーニングからのトップランクの遺伝子が、非特異的な汎ＴＣＲ刺激を使用してＴ細胞機能を改善することを示してきている。次に、同様の改善が、抗原特異的刺激を使用して観察することができるか決定することを試みた（図５Ａ）。その目的のために、Ｂ細胞マーカーであるＣＤ１９を標的とする２つのＦＤＡ承認ＣＡＲとともにいくつかのトップランク遺伝子を共発現させた（図１４Ａ～図１４Ｄ）。例としてＬＴＢＲを使用して、ＯＲＦ発現がこのトリシストロニックベクターで達成可能であることを実証した（図１４Ｅ～図１４Ｉ）。トリシストロニックベクターの配列は、配列表に提供される（概略図は、図５Ａに提供される）：

１９－２８－ｚ＋ＬＴＢＲタンパク質：配列番号３

１９－２８－ｚ＋ＬＴＢＲ　ＤＮＡ：配列番号４

１９－２８－ｚ＋ＮＧＦＲタンパク質：配列番号５

１９－２８－ｚ＋ＮＧＦＲ　ＤＮＡ：配列番号６
１９－ＢＢ－ｚ＋ＬＴＢＲタンパク質：配列番号７
１９－ＢＢ－ｚ＋ＬＴＢＲ　ＤＮＡ：配列番号８
１９－ＢＢ－ｚ＋ＮＧＦＲタンパク質：配列番号９
１９－ＢＢ－ｚ＋ＮＧＦＲ　ＤＮＡ：配列番号１０

【０２３１】

ＣＡＲは両方とも、ＣＤ２８又は４－１ＢＢから異なる共刺激ドメインを使用するため、ＣＤ２８共刺激を使用して選択されたトップランクの遺伝子が、４－１ＢＢ共刺激の状況においても機能することができるか決定することが望まれた。ＡＫＲ１Ｃ４を除いて、試験したトップランクの遺伝子のほぼ全てが、ＣＤ２５及び抗原特異的サイトカイン分泌の上方調節を改善し、分化又は疲弊表現型に大きな差はなかった（図５Ｂ、図５Ｃ、図１４Ｊ～図１４Ｐ、図１５Ａ～図１５Ｄ）。

【０２３２】

ＩＬ－２及びＩＦＮγの産生は、Ｔ細胞のクローン拡張及び抗腫瘍活性にとって重要であるが、腫瘍免疫サーベイランスの別の重要な構成要素は、直接的な細胞傷害性である。トップランクの遺伝子は、４－１ＢＢ　ＣＡＲ　Ｔ細胞よりも、ＣＤ２８　ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞傷害性に対して全体的に強力な効果を有した（図５Ｄ～図５Ｅ、図１５Ｅ、図１５Ｆ）。特に、ＬＴＢＲを共発現するＣＡＲ　Ｔ細胞は、大きな細胞クラスターを形成する傾向があることが観察され、これらのクラスターは、典型的には、対照細胞によるウェルには存在しなかったが、ＬＴＢＲ発現性細胞におけるＩＣＡＭ－１などの接着分子の全体的により高い発現と一致する（図１５Ｇ）。有効な抗腫瘍Ｔ細胞の別の重要な特徴は、長期抗原曝露にもかかわらず機能を維持する能力である。ＬＴＢＲのみ（図４Ｄ）の状況における本発明者らの以前の結果に即して、ＬＴＢＲを発現するＣＡＲ　Ｔ細胞は、ｔＮＧＦＲを発現する該当するＣＡＲ　Ｔ細胞よりも、標的細胞による反復負荷後に優れた機能性を示した（図５Ｆ、図１５Ｈ～図１５Ｊ）。

【０２３３】

健常なドナーからのＴ細胞は、操作するのが比較的容易であり、培養で機能障害性の徴候を示すことは稀であるが、がんを有する患者における自己Ｔ細胞は、しばしば機能障害性であり、限られた増殖及びエフェクター機能を示す[34]。トップランクの遺伝子が、健常なＴ細胞だけでなく、患者に由来する潜在的に機能障害性のＴ細胞においても、ＣＡＲ　Ｔ細胞応答を改善することができるか調べるために、ＬＴＢＲ又は対照遺伝子とともに共発現したＣＤ１９　ＣＡＲを、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫を有する患者からの末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に形質導入した。ＣＤ１９$^{+}$標的細胞とともに共インキュベートした後、ＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞からのＩＬ－２及びＩＦＮγの分泌は、健常なドナーで示されるものと同様の増加が観察され、特定したＯＲＦがエクスビボで、リンパ腫を有する患者からのＴ細胞を操作するために首尾よく使用できることが示された（図５Ｇ、図１５Ｋ）。注目すべきことに、ＣＤ１９－細胞に応答するサイトカインの分泌はなく、ＬＴＢＲの過剰発現は、偽の抗原非依存性応答を誘導しないことを示した。

【０２３４】

スクリーニング及びその後の検証は、ヒト末梢血中のＴ細胞の優勢なサブセットであるαβ　Ｔ細胞において行われた。αβ　Ｔ細胞に基づく免疫療法は、臨床におけるかなりの可能性を示しているが、γδＴ細胞は、ＭＨＣ制限のそれらの欠如、広範に発現されたストレスマーカーをがん種横断的手段で標的とする能力、及びより生来に似た特性のために、魅力的な代替を提供する[5]。したがって、αβ　Ｔ細胞で検証された最上位遺伝子が、γδＴ細胞に移行したか決定することを試みた。白血病又は膵管腺がん細胞との共インキュベーション後、トップランクの遺伝子で形質導入したγδＴ細胞からのＩＬ－２及びＩＦＮγ分泌における増加を観察した（図５Ｈ、図１５Ｌ～図１５Ｐ）。したがって、本発明者らのスクリーニングからのトップランクの遺伝子は、非常に多岐なＴ細胞サブセット間にさえ保存されているシグナル伝達経路に作用することができ、がん免疫療法におけるそれらの広範な適応性を強調する。

【０２３５】
考察
要約すると、ここでは、初代ヒトＴ細胞におけるゲノムスケールの機能獲得スクリーニングを開発し、ＴＣＲ駆動の増殖に対するほぼ１２，０００個の全長遺伝子の効果を大規模な並行手段で検査した。初代Ｔ細胞における以前に公表した機能獲得試験は、最大－本発明者が知る限り－であり、全長遺伝子及び合成受容体を含む、３６個の構築物が含まれた[35]。そのアプローチは、ドナーＤＮＡ及びＣａｓ９媒介性標的化挿入を介した構築物送達に依存した。標的遺伝子送達のためにドナーＤＮＡを使用することは、構築物設計、特に合成受容体を操作する観点で、より高いフレキシビリティを可能にするが、その方法は、ここで使用されたレンチウイルスライブラリよりも費用及び複雑性の観点においてスケーラビリティが低く、かつアクセシビリティが低い。したがって、ＯＲＦベースの機能獲得スクリーニングは、多数のＴ細胞表現型及び設定に容易に適用可能であり、それらは、臨床移行のための機会を提供する。実際、全てのＦＤＡ承認ＣＡＲ療法は、既にＣＡＲ導入遺伝子のレンチウイルス又はレトロウイルス組み込みに依存しており、したがって、このシステムへのＯＲＦの追加は、主な製造又は規制課題を提起しないであろう。特に特定のＯＲＦの作用様式について安全性の懸念がある場合、注入前にＣＡＲ　Ｔ細胞に送達されたＯＲＦコードｍＲＮＡの使用は、別の移行経路である。
【０２３６】
機能獲得スクリーニングは、厳密に制御されるか、特定の発達段階に制限されるか、又は特定の状況でのみ発現される、調節因子を明らかにする可能性を有する。本明細書に示されるように、ＬＴＢＲは、リンパ系由来の細胞に標準的には存在しないが、インタクトシグナル伝達経路のために、それはＴ細胞に導入されるときに合成的な役割を有することができる。他のＴＮＦＲＳＦメンバーの構成的活性化は、類似の表現型をもたらし得るが、ＬＴＢＲを区別する（スクリーニングでは、その濃縮にそれらしくつながるが、他のＴＮＦＲＳＦメンバーの濃縮にはつながらない）特徴のうちの１つは、自己分泌ループの形成であり、それによって受容体及びそのリガンドが同じ細胞内に存在する。ＬＴＢＲの発現がＩＬ－２分泌を促進することは特に注目に値し、このサイトカインはＴ細胞によって排他的に産生され、内因的にＬＴＢＲを発現する細胞型によって産生されない。サイトカイン分泌を促進することに加えて、ＬＴＢＲの過剰発現は、幹細胞性（ＴＣＦ１の発現）を促進し、活性化誘導アポトーシスを減少させ、並びにＴ細胞疲弊の表現型及び機能的特徴に対する一定のレベルの保護を提供した－これらは全て、ＬＴＢＲを内因的に発現する細胞型によって繰り返されない特徴である。細胞株におけるＬＴＢＲの過剰発現を使用した以前の研究では、ＬＴＢＲは、初代Ｔ細胞で観察された表現型とは正反対に、アポトーシス促進の役割を有することが示された[36]。転写レベル及びタンパク質レベルの分析は、ＬＴＢＲが標準的及び非標準的ＮＦ－κＢ経路の両方の構成的活性化を促進することを明らかにした。しかしながら、エピゲノムプロファイリング及びＣＲＩＳＰＲベースの機能摂動を使用して、ＬＴＢＲ発現に起因する表現型及び機能の変化が主に標準的ＮＦ－κＢ経路の活性化によって媒介されることを示したが、一方、非標準的経路における変化は、ＬＴＢＲ３７を内因的に発現する細胞における非標準的ＮＦ－κＢ活性化の十分に確立された役割とは対照的に、観察された表現型には必須ではない可能性がある。
【０２３７】
遺伝子過剰発現は、多くの試験において、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法の前臨床的増強のために使用されてきている。例えば、典型的にはＴ細胞によって産生されないが、他の細胞型によって分泌されるときにＴ細胞機能を改善することが知られている、ＩＬ－１２又はＩＬ－１８などのサイトカインでＣＡＲ　Ｔ細胞を装甲させることは、それらの抗腫瘍活性を改善することが示された[38、39]。特に、以前の試験では、ＣＡＲ　Ｔ細胞疲弊は、疲弊した細胞において特異的に枯渇したとしてＲＮＡ－ｓｅｑによって特定された転写因子であるｃ－ＪＵＮの過剰発現によって緩和できることが見出された[40]。ゲノム全体の機能獲得スクリーニングを関連する免疫療法モデルに適合させる将来の試験は、免疫抑制腫瘍微小環境を克服し、確立されたがんを根絶することができる工学的合成細胞療法のため

の高度な標的選択につながるであろう。
【０２３８】
実施例３
改善したＣＡＲ固形腫瘍応答
　スクリーニングで特定されたＬＴＢＲ及びいくつかの他のトップランクの遺伝子（ＯＲＦ、オープンリーディングフレーム）が、Ｂ細胞白血病の状況における抗ＣＤ１９　ＣＡＲの抗腫瘍応答を促進することを示してきた。ここでは、活性の同様な改善が、膵臓がんの状況において、２つの臨床的に試験された抗メソテリンＣＡＲ（４－１ＢＢ又はＣＤ２８共刺激ドメインのいずれかを使用して）と併せて示すことができるか試験した。ＣＡＲ及びＯＲＦを共発現するＴ細胞を、高レベルのメソテリンを発現する膵臓がん株であるＣａｐａｎ－２、ＣＡＲ標的、及び低レベルのメソテリンを発現する膵臓がん株であるＢｘＰＣ３に対して試験した（図１６Ａ）。トリシストロニックベクターの配列は、配列表に提供される（概略図は、図１６Ａに提供される）：
　ＳＳ１－２８－ｚ＋ＬＴＢＲタンパク質：配列番号１１
　ＳＳ１－２８－ｚ＋ＬＴＢＲ　ＤＮＡ：配列番号１２
　ＳＳ１－ＢＢ－ｚ＋ＬＴＢＲタンパク質：配列番号１３
　ＳＳ１－ＢＢ－ｚ＋ＬＴＢＲ　ＤＮＡ：配列番号１４
【０２３９】
　一晩の共インキュベーション後、試験したＯＲＦの１つ以外全て（すなわち、ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ、及びＬＴＢＲ）が、メソテリン高細胞株Ｃａｐａｎ－２に対するＣＡＲ（４１ＢＢ又はＣＤ２８のいずれか）とともに使用したとき、ＩＦＮγの抗原特異的分泌を促進したことが決定された（図１６Ｂ）。ＩＬ－２分泌の促進に関して、ＬＴＢＲを使用した場合、陰性（ｔＮＧＦＲ）対照を超える顕著な改善が観察され、ＡＨＮＡＫを使用してより少ない程度で観察された（図１６Ｃ）。メソテリン低株ＢｘＰＣ３に対する反応性に関して、陰性対照を超える改善が、ＩＬ１２Ｂ又はＬＴＢＲを過剰発現するＴ細胞で主に観察された（図１６Ｄ）。
【０２４０】
　サイトカイン分泌は、生産的な抗腫瘍応答の局面のうちの１つであり、別の１つは直接的な細胞傷害性である。したがって、最上位遺伝子を共発現するＣＡＲ　Ｔ細胞が、ＧＦＰ＋Ｃａｐａｎ２又はＢｘＰＣ３細胞を殺滅する能力を試験した（図１６Ｅ、図１６Ｆ）。試験した６つの最上位遺伝子（ＧＰＤ１を含む）のうちのいずれかを過剰発現するＣＡＲ　Ｔ細胞によって示されるメソテリン高Ｃａｐａｎ－２に対する増加した細胞傷害性は、サイトカイン分泌における改善を考慮して予想されたが、ＢｘＰＣ３細胞に対する増加した細胞傷害性も観察された。したがって、スクリーニングで特定されたトップランクの遺伝子（ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ、及びＬＴＢＲを含むが、これらに限定されない）は、異なるがんタイプ（Ｂ細胞白血病などの液体腫瘍及び膵臓がんなどの固形腫瘍を含む）において、並びに異なる標的抗原密度（メソテリン高及びメソテリン低細胞株）で、異なる共刺激ドメイン（ＣＤ２８又は４－１ＢＢ）を使用した多様なＣＡＲ（以前に示された抗ＣＤ１９、ここに示された抗メソテリン）の反応性を促進できたと結論付けた。
【０２４１】
実施例４
固形腫瘍におけるＴＣＲの改善した活性
　Ｔ細胞療法は、ＣＡＲ又はＴＣＲのいずれかを使用して、所与の腫瘍標的に細胞を再指向させることに依存することができる。前者は、異なる患者の腫瘍を、それらのＨＬＡハプロタイプに関係なく標的とすることができる利点を有するが、後者はまた、細胞内にある抗原を標的とすることができる（全ての細胞タンパク質からのエピトープがＨＬＡ分子によってサンプリングされ、ＨＬＡ分子に提示されるため）。ここでは、黒色腫、多発性骨髄腫、肉腫、肺がんを含むが、これらに限定されない多くのがん組織学において一般的に発現されるＮＹ－ＥＳＯ－１からのエピトープに対して指向される臨床的に試験された

ＴＣＲを使用した。サイズの制限により、Ｔ細胞を共形質導入するために使用した２つの別個のレンチウイルスでＴＣＲ及び遺伝子（ＯＲＦ、オープンリーディングフレーム）を送達した（図１７Ａ）。次に、二重形質導入Ｔ細胞を、ピューロマイシンを使用して（ＯＲＦレンチウイルスで形質導入されたＴ細胞のみが生存する）、及びＮＹ－ＥＳＯ－１ＴＣＲ陽性細胞の抗体ベースの選択を使用して（Ｔ細胞活性化を防止し、したがって選択プロセス中に活性化誘導性細胞死を防止するダサチニブの存在下）選択した。

【０２４２】

次に、操作したＣＤ８＋Ｔ細胞を、ＨＬＡ－Ａ２＋ＮＹ－ＥＳＯ－１＋黒色腫株Ａ３７５に対して試験した。試験したほとんどの遺伝子は、サイトカインＩＦＮγ及びＩＬ２の片方又は両方の分泌を増加させた（図１７Ｂ、図１７Ｃ）。また、Ａ３７５細胞に対する直接的な細胞傷害性を測定し、試験した全ての遺伝子が、陰性対照遺伝子ｔＮＧＦＲを共発現するＴＣＲ形質導入Ｔ細胞よりも優れた細胞傷害性を示したことを実証した（図１７Ｄ）。したがって、スクリーニングで特定されたトップランクの遺伝子（ＡＨＮＡＫ、ＢＡＴＦ、ＧＰＤ１、ＩＦＮＬ２、ＩＬ１２Ｂ、及びＬＴＢＲを含むが、これらに限定されない）が、がん特異的ＴＣＲで操作されたＴ細胞の反応性を促進することができたと結論付けた。

【０２４３】

実施例５

ＬＴＢＲ共送達は、インビボでの抗ＣＤ１９　４－１ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ活性を改善する。

本発明者らは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲと同じレンチウイルスベクターでのＬＴＢＲの同時送達が、インビトロで優れた抗腫瘍活性をもたらすことを既に示している（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　２０２２）。ここでは、抗ＣＤ１９　ＣＡＲ（ＦＭＣ６．３　ｓｃＦｖ、ＣＤ８ストーク及び膜貫通ドメイン、４－１ＢＢ及びＣＤ３ｚシグナル伝達ドメイン：１９－ＢＢ－ｚ）の有効性を、ＬＴＢＲを添加するか又は無添加で、播種性白血病であるＮａｌｍ６の免疫不全（ＮＳＧ）マウスモデルで試験した（図２２Ａ）。非形質導入Ｔ細胞（ＣＤ４及びＣＤ８、１：１の比）で処置したマウスは、腫瘍接種後に１９日間の中央値で生存したが、無関連の遺伝子ｔＮＧＦＲを共発現するＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、それらの生存期間が２３日間の中央値に延長された（非形質導入Ｔ細胞より２０％増加）。対照的に、ＬＴＢＲを共発現するＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスは、３１日間の中央値で生存した（非形質導入Ｔ細胞より６３％増加、及び対照ＣＡＲ　Ｔ細胞より３５％増加）（図２２Ｂ）。更に、ＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞は、対照ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、処置されたマウスにおける腫瘍負荷を有意に減少させた（図２２Ｃ）。最後に、いずれのＣＡＲ　Ｔ細胞産物で処置したマウスも、終了時に肉眼的な病理検査によって決定されたとき、特定の傷害性は観察されず、観察された体重減少は、このモデルに典型的であり、腫瘍負荷に起因する。ＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の改善した抗腫瘍有効性に即して、体重の減少は、非形質導入又は対照ＣＡＲ　Ｔ細胞と比較して、ＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ細胞で処置したマウスにおいて実質的に遅延された（図２２Ｄ）。

【０２４４】

実施例６

ＬＴＢＲ共送達は、ＩＬ２の非存在下で抗ＣＤ１９　４－１ＢＢ－ｚ　ＣＡＲ生存を改善するが、白血病形質転換をもたらさない。

本発明者らは、ＬＴＢＲが、Ｔ細胞増殖を促進し、アポトーシスを低減することを既に示している（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　２０２２）。しかしながら、Ｔ細胞増殖／アポトーシスの回避を誘導することができる遺伝子の構成的導入は、悪性形質転換の可能性を高める。ＬＴＢＲが、サイトカインの非存在下でＴ細胞を生存及び／又は増殖させることができ得るか試験するために、標準的なプロトコルに従って、いずれのサイトカインも添加しないか、又は外因性ＩＬ２を添加した培地で、ＣＡＲ＋ＬＴＢＲ又は対照遺伝子ｔＮＧＦＲで形質導入したＴ細胞を培養した。ＣＡＲ　Ｔ細胞の両方の集団である形質導入されたｔＮＧＦＲ及びＬＴＢＲは、ＩＬ２中止後に急速な細胞死を受けた（図２３）。初期段階では、ＬＴＢＲの抗アポトーシス効果に即して、ＬＴＢＲ　ＣＡＲ　Ｔ

細胞は、ＩＬ２の不存在下で対照ＣＡＲ　Ｔ細胞よりも良好に生存したが、実験の経過にわたって、両方のＴ細胞型は、ＩＬ２非依存的な、悪性的に形質転換された可能性のあるＴ細胞集団の増殖のいかなる証拠もなしに、生存能の完全な喪失に到達した。したがって、我々は、構成的ＬＴＢＲの発現は、形質導入Ｔ細胞の悪性的な形質転換を引き起こさないと結論付けた。

【０２４５】

実施例７

ＬＴＢＲ表現型は、使用される培地に依存しない。

研究又は臨床適用のいずれかのために、Ｔ細胞のエクスビボ拡張に使用される細胞培養培地の組成は、Ｔ細胞の表現型、機能、及び臨床的有効性に実質的な影響を及ぼすことができる（Ｓａｒａｈ　ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ　ｒｅｌｅｖａｎｔ　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ｍｅｄｉａ　ａｃｔｉｖａｔｅ　ｄｉｓｔｉｎｃｔ　ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　ｐｒｏｇｒａｍｓ　ｕｎｃｏｕｐｌｅｄ　ｆｒｏｍ　ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｍｅｔｈｏｄｓ＆Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｖｏｌｕｍｅ　２４，Ｍａｒｃｈ　２０２２，Ｐａｇｅｓ　３８０－３９３）。ここでは、培地組成物が、Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ発現によって誘導される表現型に影響を及ぼすか決定することが望まれた。したがって、以下に列挙される５つの異なる培地タイプ（全て１０ｎｇ／ｍｌのｒｈＩＬ２で補充）で新たに単離されたＴ細胞を培養した：

１－ＡＩＭ　Ｖ＋５％ＦＢＳ＋１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｌｙｎｎ　ｅｔ　ａｌ，ｃ－Ｊｕｎ　ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｉｎ　ＣＡＲ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎｄｕｃｅｓ　ｅｘｈａｕｓｔｉｏｎ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，Ｎａｔｕｒｅ，５７６，２９３－３００（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１９））

２－ＡＩＭ　Ｖ＋５％ヒト血清（Ｇｕｒｕｓａｍｙ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｕｌｔｉ－ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　Ｓｃｒｅｅｎ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ　ｐ３８　Ｋｉｎａｓｅ　ａｓ　ａ　Ｔａｒｇｅｔ　ｆｏｒ　Ａｄｏｐｔｉｖｅ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｉｅｓ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ．２０２０　Ｊｕｎ　８；３７（６）：８１８－８３３．ｅ９）

３－ＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳ＋１０ｍＭのＨＥＰＥＳ＋１ｍＭのピルビン酸ナトリウム＋１×非必須アミノ酸（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，ＣＲＩＳＰＲ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ＴＣＲ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ　ｇｅｎｅｒａｔｅｓ　ｓｕｐｅｒｉｏｒ　ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ，Ｂｌｏｏｄ．２０１８　Ｊａｎ　１８；１３１（３）：３１１－３２２）

４－ＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ－ＸＦ　Ｔ細胞拡張培地（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，Ａ　ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ　ｓｃｒｅｅｎ　ｆｏｒ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｄｒｉｖｅｒｓ　ｏｆ　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ．２０２２　Ｍａｒ；６０３（７９０２）：７２８－７３５）

５－Ｘ－Ｖｉｖｏ１５＋５％ＦＢＳ＋５０μＭのβ－メルカプトエタノール＋１０ｍＭのＮ－アセチル－Ｌ－システイン（Ｓｈｉｆｒｕｔ，ｅｔ　ａｌ，Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｓｃｒｅｅｎｓ　ｉｎ　Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｈｕｍａｎ　Ｔ　Ｃｅｌｌｓ　Ｒｅｖｅａｌ　Ｋｅｙ　Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，Ｃｅｌｌ．２０１８　Ｄｅｃ　１３；１７５（７）：１９５８－１９７１．ｅ１５）

【０２４６】

レンチウイルスの形質導入、選択、及び培養後、Ｔ細胞を再刺激し、分泌されたサイトカインＩＦＮγ（図２４Ａ）及びＩＬ２（図２４Ｂ）の量を測定した（左から右へ、未処置、ｔＮＧＦＲ、ＬＴＢＲ）。以前に示したように、ＬＴＢＲの過剰発現は、刺激時に分泌されるサイトカインのレベルを顕著に増加させた。サイトカインの絶対量は、異なる培地組成物間で異なるが、ＬＴＢＲの過剰発現は、試験したほぼ全ての事例において、無関係の遺伝子ｔＮＧＦＲで観察されたものよりもサイトカインレベルを増加させた（図２４Ｃ）。

【０２４７】
ＴＩＬＴＢＲ過剰発現の別の特徴は、タンパク質レベルで検出可能であるＣＤ５４及びＣＤ７４を含む数百の遺伝子の発現の変化である。前に示されたデータに即して、ＬＴＢＲ　Ｔ細胞におけるＣＤ５４及びＣＤ７４発現の増加が、試験した全ての培地で同程度まで観察された（図２４Ｄ）。ＬＴＢＲ　Ｔ細胞はまた、操作されたＴ細胞産物の改善された臨床的有効性に関連する、セントラルメモリー表現型での優先的な濃縮を示し、－セントラルメモリー中枢記憶表現型でのこの優先は、試験した培地タイプの１つ以外の全てにおいてＬＴＢＲ　Ｔ細胞で観察された（図２４Ｅ）。最後に、ＬＴＢＲは、阻害性チェックポイントＰＤ－１での発現を含む、Ｔ細胞における疲弊の特徴を軽減する。試験した全ての培地組成物において、ＬＴＢＲ発現性Ｔ細胞におけるＰＤ１レベルでの有意な低下が観察された（図２４Ｆ）。

【０２４８】
したがって、異なる培地組成物がＴ細胞表現型及び機能的応答に影響を及ぼすが、ＬＴＢＲ過剰発現は、使用される培地に関係なく、臨床的に関連するＴ細胞表現型を改善すると結論付けられる。

【０２４９】
実施例８
ＬＴＢＲ表現型は、他のＴＮＦＲＳＦメンバーによって表現型模写されない。
ＬＴＢＲは、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）として知られるタンパク質ファミリーのメンバーである。ＴＮＦＲＳＦメンバーは、同様の分子機序及び経路を介して作用すると考えられており（Ｄｏｓｔｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｔｈｅ　ＴＮＦ　Ｆａｍｉｌｙ　ｏｆ　Ｌｉｇａｎｄｓ　ａｎｄ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ：Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ　Ｍｏｄｕｌｅｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｓｙｓｔｅｍ　ａｎｄ　Ｂｅｙｏｎｄ，Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｒｅｖ９９：１１５－１６０，２０１９，ｅｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２０１８）－したがって、Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ過剰発現で観察された表現型が、他のＴＮＦＲＳＦメンバーを過剰発現することによって複製され得るかを証明することが望まれた。健常なドナーからのＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞において、ＬＴＢＲ及び無関連遺伝子ｔＮＧＦＲと一緒に、１３個のＴＮＦＲＳＦメンバーをクローニングし、過剰発現させた。内因的レベルの発現にもかかわらず、試験したＴＮＦＲＳＦメンバーでは高レベルの過剰発現が達成された（図２５Ａ）。次いで、形質導入したＴ細胞を刺激し、４日後にＴ細胞増殖を調べた。以前に実証されたように、ＬＴＢＲは、ＣＤ４及びＣＤ８　Ｔ細胞の両方についてＴ細胞増殖に強力な増加を駆動した（図２５Ｂ）。試験した他のＴＮＦＲＳＦの場合、ＣＤ４増殖のわずかな（最善で）増加のみが観察され、ＣＤ８増殖の増加は観察されなかった。刺激後のサイトカイン分泌の増加におけるＬＴＢＲ過剰発現の別の特徴。しかしながら、試験した１４個のＴＮＦＲＳＦメンバーのうち、ＬＴＢＲのみが、ＣＤ４及びＣＤ８の両方において、ＩＦＮγ分泌の強力な増加を誘導した（図２５Ｃ）。したがって、ＬＴＢＲは、他のＴＮＦＲＳＦメンバーと比較して、Ｔ細胞における過剰発現時に異なるプログラムを駆動すると結論付けられた。

【０２５０】
実施例９
ＬＴＢＲ表現型は、ＮＦｋＢ経路の構成的に活性な正の調節因子の過剰発現によって表現型複写されない。
ＬＴＢＲ表現型は、ＮＦκＢ経路の構成的な活性化に依存することを以前に示した。したがって、ＮＦκＢ経路における主要メディエーターの構成的に活性なバリアント、具体的には以下の変異体を送達することによって、ＬＴＢＲを過剰発現するＴ細胞で観察される表現型を複製することを試みた：
・ＡＫＴ１（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒａｒｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｖａｒｉａｎｔｓ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ　Ｏｎｃｏｇｅｎｉｃ　Ａｌｌｅｌｅｓ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｉｓｃｏｖ．２０１６　Ｊｕｌ；６（７）：７１４－２６．ｄｏｉ：１０．１１５８／２１５９－８２９

０．ＣＤ－１６－０１６０．Ｅｐｕｂ　２０１６　Ｍａｙ　４）
・ＩＫＫ２（Ｍｅｒｃｕｒｉｏ　ｅｔ　ａｌ，ＩＫＫ－１　ａｎｄ　ＩＫＫ－２：ｃｙｔｏｋｉｎｅ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ＩｋａｐｐａＢ　ｋｉｎａｓｅｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｆｏｒ　ＮＦ－ｋａｐｐａＢ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９７　Ｏｃｔ　３１；２７８（５３３９）：８６０－６．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．２７８．５３３９．８６０）
・ＳＴＡＴ５（Ｒｉｃｈｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ，Ｎｏｎ－ｃａｎｏｎｉｃａｌ　Ｈ３Ｋ７９ｍｅ２－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｐａｔｈｗａｙｓ　ｐｒｏｍｏｔｅ　ｔｈｅ　ｓｕｒｖｉｖａｌ　ｏｆ　ＭＬＬ－ｒｅａｒｒａｎｇｅｄ　ｌｅｕｋｅｍｉａ，Ｅｌｉｆｅ，２０２１　Ｊｕｌ　１５；１０：ｅ６４９６０．ｄｏｉ：１０．７５５４／ｅＬｉｆｅ．６４９６０．）
・ｐ６５（Ｈｅ　ａｎｄ　Ｗｅｂｅｒ，Ｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＮＦ－ＫａｐｐａＢ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｂｙ　ｃｙｃｌｉｃ　ＧＭＰ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｋｉｎａｓｅ．Ａ　ｎｏｎｃａｎｏｎｉｃａｌ　ｐａｔｈｗａｙ　ｔｏ　ＮＦ－ｋａｐｐａＢ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ，Ｅｕｒ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００３　Ｍａｙ；２７０（１０）：２１７４－８５．ｄｏｉ：１０．１０４６／ｊ．１４３２－１０３３．２００３．０３５７４．ｘ），
・ＮＦＫＢ１の処理した活性バリアント、ｐ５０（Ｂａｌｌａｒｄ　ｅｔ　ａｌ，Ｔｈｅ　６５－ｋＤａ　ｓｕｂｕｎｉｔ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ＮＦ－ｋａｐｐａ　Ｂ　ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ　ａｓ　ａ　ｐｏｔｅｎｔ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ａｎｄ　ａ　ｔａｒｇｅｔ　ｆｏｒ　ｖ－Ｒｅｌ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．１９９２　Ｍａｒ　１；８９（５）：１８７５－９．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．８９．５．１８７５．）。

【０２５１】

初代ヒトＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞の形質導入及び選択から２週間後、ＬＴＢＲ過剰発現表現型の特徴：刺激時のサイトカインの増加した分泌、及び休止Ｔ細胞における選択された細胞表面マーカーの増加した発現を調べた。サイトカイン分泌に関して、ＡＫＴ１又はＳＴＡＴ５を発現するＣＤ８　Ｔ細胞においてＩＦＮγの顕著な増加が観察されたが、ＣＤ４　Ｔ細胞では観察されず、ＩＫＫ２を発現するＴ細胞において中程度の増加が観察された（図２６Ａ）。逆に、Ｔ細胞におけるＡＫＴ１発現は、ＩＬ２のレベルを増加させなかったが、ＳＴＡＴ５及びＩＫＫ２は、それをわずかに増加させた（図２６Ｂ）。試験した遺伝子バリアントのいずれも、サイトカイン分泌を増強するという点でＬＴＢＲを上回らなかった。

【０２５２】

ＬＴＢＲ過剰発現は、タンパク質レベルで検出することができる増加したレベルのＣＤ５４、ＣＤ７４、ＣＤ７０、及びＭＨＣ－ＩＩ含む、Ｔ細胞における数百の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが示されている。ＳＴＡＴ５、及びより少ない程度までのＩＫＫ２の過剰発現は、これらのマーカーのうちの３つのかなり増加したレベルをもたらし、いくつかの例では、ＬＴＢＲのそれを上回った（図２６Ｃ～Ｆ）。全てをまとめると、ＮＦκＢ経路における主要なメディエーターのいくつかの構成的に活性なバリアントの過剰発現は、ＬＴＢＲのものと類似した表現型をもたらすことができるが、試験したタンパク質はいずれも、Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ誘導性プログラムの息遣い及び強さを完全には形質型複写することはできない（図２６Ｇ）。

【０２５３】

実施例１０

ＬＴＢＲ表現型は、ＮＦｋＢ経路の負の制御因子のノックアウトによって表現型複写されないが、当該ノックアウトによって更に増強することができる。

ＬＴＢＲ表現型は、ＮＦκＢ経路の構成的活性化に依存することを以前に示した。したがって、ＮＦκＢ経路の２つの主要な阻害因子、すなわちＴＮＦＡＩＰ３（Ａ２０として

も知られる）及びＮＦＫＢＩＡ（ＩκＢαとしても知られる）をノックアウトすることによって、ＬＴＢＲを過剰発現するＴ細胞で観察された表現型を複製することを試みた。そうするために、ＴＮＦＡＩＰ３、ＮＦＫＢＩＡ（各々３つの独立したｓｇＲＮＡ）又は非標的化（ＮＴ）ｓｇＲＮＡ（２つのｓｇＲＮＡ）を標的とするｓｇＲＮＡとともに（同じベクターで）、ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲのいずれかを初代ＣＤ４Ｔ細胞にレンチウイルスによって送達した。レンチウイルスの組み込み後、Ｔ細胞を、以前に報告されたように（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　２０２２）Ｃａｓ９タンパク質を用いてエレクトロポレーションした。

【０２５４】

初代ヒトＣＤ４　Ｔ細胞の形質導入及び選択から２週間後、ＬＴＢＲ過剰発現表現型の特徴：刺激時のサイトカインの増加した分泌、及び休止Ｔ細胞における選択された細胞表面マーカーの増加した発現を調べた。サイトカイン分泌に関して、ＴＮＦＡＩＰ３又はＮＦＫＢＩＡをノックアウトすることは、ｔＮＧＦＲ　Ｔ細胞においてほとんどいかなる効果も示さなかったが、逆に、ＬＴＢＲ　Ｔ細胞においてどちらかの遺伝子をノックアウトすることで、ＩＦＮγ（図２７Ａ）及びＩＬ２（図２７Ｂ）の分泌を堅牢に増加させた。非常に類似した表現型が、休止Ｔ細胞で観察され、ＬＴＢＲ過剰発現時に上方調節された代表的な遺伝子（ＣＤ５４、ＣＤ７４、ＣＤ７０、及びＭＨＣ－ＩＩ）のタンパク質発現を調べると、ｔＮＧＦＲ細胞におけるＴＮＦＡＩＰ３又はＮＦＫＢＩＡをノックアウトすることは、当該遺伝子の発現の意味ある変化をもたらさなかったが、それらはＬＴＢＲ　Ｔ細胞において更に上方調節されるようになった（図２７Ｃ～Ｆ）。まとめると、ＮＦκＢ経路の負の調節因子をそれ自体でノックアウトすることは、ＬＴＢＲ過剰発現に認められる表現型を複製することができないが－ＬＴＢＲが存在する場合、これらの負の調節因子を除去することは、ＬＴＢＲ効果を更に促進することができる（図２７Ｇ）。

【表４】

表４．ｓｇＲＮＡ配列。

ID	配列	配列番号
NT sgRNA 1	ACGGAGGCTAAGCGTCGCAA	15
NT sgRNA 2	CGCTTCCGCGGCCCGTTCAA	16
TNFAIP3 sgRNA 1	TTGCTCAAATACAAAGCCTG	17
TNFAIP3 sgRNA 2	TGAGAGACTCCAGTTGCCAG	18
TNFAIP3 sgRNA 3	GGCTTCCACAGACACACCCA	19
NFKBIA sgRNA 1	CAACCAGCCAGAAATTGCTG	20
NFKBIA sgRNA 2	TTCCAGGGCTCCGAGCCGCG	21
NFKBIA sgRNA 3	GTTGTTCTGGAAGTTGAGGA	22

【０２５５】

実施例１１

レンチウイルスＣＡＲ発現内のＬＴＢＲ導入遺伝子の位置決めは、発現レベル及び機能的応答に影響を与える。

以前に、ＣＡＲ及びピューロマイシン耐性遺伝子と同じトリシストロニックベクターから共発現されたＬＴＢＲ（ＣＡＲ－ｐｕｒｏ－ＬＴＢＲ）は、バイシストロニックベクター（ＬＴＢＲ－ｐｕｒｏ）から発現されたときよりも低いレベルで発現されることが観察された（Ｌｅｇｕｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　２０２２）。したがって、ピューロマイシン耐性遺伝子を除去し、ベクター内のＬＴＢＲの異なる配置（ＣＡＲ－ＬＴＢＲ又はＬＴＢＲ－ＣＡＲ）を試験することによって、ＣＡＲ　Ｔ細胞におけるＬＴＢＲ発現を改善することを試みた（図２８Ａ）。ベクター構造における変化に起因し得る形質導入効率及びＣＡＲ発現レベルを制御するために、ＬＴＢＲの代わりに無関連な遺伝子ｔＮＧＦＲを含むベクターも生成した。使用されたベクターは、配列表に開示される。

１９ＢＢｚ－Ｐ２Ａ－ｐｕｒｏ－Ｔ２Ａ－ｔＮＧＦＲ　－　配列番号：２５＆２６

１９ＢＢｚ－Ｐ２Ａ－ｐｕｒｏ－Ｔ２Ａ－ＬＴＢＲ　－　配列番号：２７＆２８
１９２８ｚ－Ｐ２Ａ－ｐｕｒｏ－Ｔ２Ａ－ｔＮＧＦＲ　－　配列番号：２９＆３０
１９２８ｚ－Ｐ２Ａ－ｐｕｒｏ－Ｔ２Ａ－ＬＴＢＲ　－　配列番号：３１＆３２
１９ＢＢｚ－Ｐ２Ａ－ｔＮＧＦＲ　－　配列番号：３３＆３４
１９２８ｚ－Ｐ２Ａ－ｔＮＧＦＲ　－　配列番号：３５＆３６
１９ＢＢｚ－Ｐ２Ａ－ＬＴＢＲ　－　配列番号３７＆３８
１９２８ｚ－Ｐ２Ａ－ＬＴＢＲ　－　配列番号３９＆４０
ｔＮＧＦＲ－Ｐ２Ａ－１９ＢＢｚ　－　配列番号４１＆４２
ｔＮＧＦＲ－Ｐ２Ａ－１９２８ｚ　－　配列番号４３＆４４
ＬＴＢＲ－Ｐ２Ａ－１９ＢＢｚ　－　配列番号４５＆４６
ＬＴＢＲ－Ｐ２Ａ－１９２８ｚ　－　配列番号４７＆４８
ＥＦＳ－ｔＮＧＦＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号４９
（プロモーターなし）ｔＮＧＦＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－配列番号５０
ＮＦＡＴ－ｔＮＧＦＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５１
ＮＦｋＢ－ｔＮＧＦＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５２
ＡＰ１－ｔＮＧＦＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５３
ＥＦＳ－ＬＴＢＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５４
（プロモーターなし）ＬＴＢＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－配列番号５５
ＮＦＡＴ－　ＬＴＢＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５６
ＮＦｋＢ－　ＬＴＢＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５７
ＡＰ１－　ＬＴＢＲ　ＰＧＫ－ｐｕｒｏ　－　配列番号５８

【０２５６】

対応するＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子ベクターに対して正規化した導入遺伝子（ＬＴＢＲ又はｔＮＧＦＲ）の発現を調ると、ピューロマイシン耐性遺伝子（ＣＡＲ－遺伝子）を除去することは、ＬＴＢＲレベルにはわずかな効果のみだが、ｔＮＧＦＲレベルにはるかに強い効果を有し、逆に、ＣＡＲの上流に遺伝子を配置すること（Ｇｅｎｅ－ＣＡＲ）は、ｔＮＧＦＲではなく、ＬＴＢＲのはるかに強い発現をもたらしたことが観察された（図２８Ｂ）。

【０２５７】

導入遺伝子発現レベルにおける変化の機能的影響を評価するために、異なるＣＡＲベクターで操作されたＴ細胞を、抗原を発現する標的細胞に曝露し、標的結合に応答して分泌されるサイトカインの量を測定した。全体として、試験した全てのシステム（ＣＡＲにおける４－１ＢＢ又はＣＤ２８共刺激、ＣＤ４又はＣＤ８Ｔ細胞、ＩＬ２又はＩＦＮγ分泌）にわたって、ＬＴＢＲ発現レベルとＣＡＲ機能応答との間に明確な用量依存性があり、ＣＡＲ－ｐｕｒｏ－ＬＴＢＲは最低の応答を示し、ＣＡＲ－ＬＴＢＲは中度の応答を示し、ＬＴＢＲ－ＣＡＲは最高の応答を示した（図２８Ｃ～Ｅ）。興味深いことに、ｔＮＧＦＲの場合、ＣＡＲ－ｔＮＧＦＲベクターは最も強い反応をもたらしたが、ＣＡＲ－ｐｕｒｏ－ｔＮＧＦＲとｔＮＧＦＲ－ＣＡＲとの間に意味ある差はなかった。要約すると、ＣＡＲ－遺伝子ベクターは、おそらく増加したＣＡＲ発現レベルに起因して、ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲ導入遺伝子の両方の場合において、ＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子ベクターよりも標的細胞に対するより強い機能的応答をもたらした。逆に、遺伝子－ＣＡＲ設計では、ｔＮＧＦＲではなくＬＴＢＲ導入遺伝子のみが、ＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子ベクターを上回る機能的応答における顕著な増加を示した（図２８Ｆ）。考えられる説明は、ＣＡＲ発現がＣＡＲ－ｐｕｒｏ－遺伝子と遺伝子－ＣＡＲとの間で類似しており（前者の場合は導入遺伝子の増加したサイズによるものであり、後者の場合はベクターにおけるＣＡＲの配置によるものである）、両方の場合ともＣＡＲ－遺伝子ベクターにおける発現よりも低いことである。ＬＴＢＲの状況では、遺伝子－ＣＡＲベクターにおけるより高いＬＴＢＲ発現からの利得は、全体的なより低いＣＡＲ発現からの損失を相殺する。

【０２５８】

実施例１２

ＬＴＢＲの誘導性発現。
導入遺伝子発現を制御することは、操作したＴ細胞療法の安全性プロファイルを改善するための魅力的な可能性を提供する。具体的には、ＬＴＢＲ（又は他の増強因子導入遺伝子）が、Ｔ細胞がその標的細胞に遭遇し、抗原受容体（ＣＡＲ又はＴＣＲ）を介してシグナルを受けた後にのみ発現され、標的細胞が除去され、抗原受容体がシグナルを伝達しなくなると、増強因子遺伝子発現がバックグラウンドレベルまで崩壊するシステムを想定することができる。それを試験するために、Ｔ細胞刺激：ＮＦＡＴ、ＮＦκＢ、及びＡＰ１（全てＪｕｔｚ ｅｔ ａｌ，Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ｏｆ ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｏｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｉｎ ａ ｔｒｉｐｌｅ ｐａｒａｍｅｔｅｒ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｌｉｎｅ：Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ ＮＦ－κＢ，ＮＦＡＴ ａｎｄ ＡＰ－１，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１６ Ｍａｒ；４３０：１０－２０．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｊｉｍ．２０１６．０１．００７．Ｅｐｕｂ ２０１６ Ｊａｎ １５から）で上方調節された転写因子によって活性化される誘導性プロモーターを介してＬＴＢＲ発現を駆動する（又は遺伝子ｔＮＧＦＲを制御する）レンチウイルスベクターを設計した。陽性対照として、強力な構成的プロモーター（ＥＦＳ）を介して導入遺伝子発現を駆動するベクターを含め、一方、陰性対照について、導入遺伝子の上流にプロモーターを欠いているベクターを設計した。全てのベクターはまた、別個のプロモーターから駆動される選択マーカー（ピューロマイシン耐性）を含有して、試験したプロモーターにかかわらず形質導入細胞の完全な選択を可能にした（図２９Ａ）。

【０２５９】
初代ヒトＴ細胞（ＣＤ４及びＣＤ８）の単離、形質導入、及び選択から１４日後、抗ＣＤ３／ＣＤ２８抗体を有する各ベクターで形質導入したＴ細胞を活性化した。再刺激後２４時間（図２９Ｂ～Ｄ）、４８時間、及び７２時間（データ図示せず）で、導入遺伝子ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲの発現を測定し、それを対照として非刺激Ｔ細胞での発現と比較した。ＮＦＡＴ及びＡＰ１プロモーターの場合、刺激を伴うか又伴わずに、意味のある導入遺伝子発現は観察されなかった。構成的プロモーターＥＦＳの場合、おそらく活性化／分裂しているＴ細胞における転写及び翻訳の増加した割合に起因して、刺激後の導入遺伝子（ＬＴＢＲ及びｔＮＧＦＲの両方）発現の増加が観察された。興味深いことに、ＮＦκＢプロモーターは、構成的ＥＦＳプロモーター（図２９Ｂ）からのものよりも、休止Ｔ細胞及び刺激したＴ細胞の両方においてＬＴＢＲの強い発現を駆動し、それはＬＴＢＲのＮＦκＢ経路の構成的活性化（Ｌｅｇｕｔ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ２０２２）によって説明することができた。逆に、ｔＮＧＦＲは、刺激後のみＮＦκＢプロモーターから発現された（図２９Ｃ）。したがって、ＮＦκＢプロモーターは、Ｔ細胞における誘導性の刺激依存性導入遺伝子発現のために使用することができるが、ＬＴＢＲなどのＮＦκＢ活性化導入遺伝子と併用しないことを決定した（図２９Ｄ）。ＬＴＢＲでは、ＮＦκＢプロモーターは、それがＥＦＳよりも導入遺伝子のより高い発現を駆動することができることを考えると、ＥＦＳプロモーターに対する魅力的な代替を提供する。

【０２６０】
参考文献

１．Ａｂｒａｍｓｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｔｒａｎｓｃｅｎｄ ＮＨＬ ００１：ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＣＤ１９－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ＣＡＲ Ｔ－ｃｅｌｌ ｐｒｏｄｕｃｔ ＪＣＡＲ０１７ ｒｅｓｕｌｔｓ ｉｎ ｈｉｇｈ ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｒａｔｅｓ ｉｎ ｒｅｌａｐｓｅｄ ｏｒ ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ｂ－ｃｅｌｌ ｎｏｎ－Ｈｏｄｇｋｉｎ ｌｙｍｐｈｏｍａ．Ｂｌｏｏｄ １２８，４１９２－４１９２（２０１６）．
２．Ｓｈｉｆｒｕｔ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ＣＲＩＳＰＲ ｓｃｒｅｅｎｓ ｉｎ ｐｒｉｍａｒｙ ｈｕｍａｎ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｒｅｖｅａｌ ｋｅｙ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．Ｃｅｌｌ １７５，１９５８－１９７１（２０１８）．

3. Dong, M. B. et al. Systematic immunotherapy target discovery using genome-scale in vivo CRISPR screens in CD8 T cells. Cell 178, 1189-1204 (2019).
4. Chen, Z. et al. In vivo CD8+ T cell CRISPR screening reveals control by Fli1 in infection and cancer. Cell 184, 1262-1280 (2021).
5. Kabelitz, D., Serrano, R., Kouakanou, L., Peters, C. & Kalyan, S. Cancer immunotherapy with γδ T cells: many paths ahead of us. Cell. Mol. Immunol. 17, 925-939 (2020).
6. Munshi, N. C. et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma. N. Engl. J. Med. 384, 705-716 (2021).
7. Fraietta, J. A. et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nat. Med. 24, 563-571 (2018).
8. Singer, M. et al. A distinct gene module for dysfunction uncoupled from activation in tumor-infiltrating T cells. Cell 166, 1500-1511 (2016).
9. Gurusamy, D. et al. Multi-phenotype CRISPR-Cas9 screen identifies p38 kinase as a target for adoptive immunotherapies. Cancer Cell 37, 818-833 (2020).
10. Legut, M., Dolton, G., Mian, A. A., Ottmann, O. G. & Sewell, A. K. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. Blood 131, 311-322 (2018).
11. Ren, J. et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. Clin. Cancer Res. 23, 2255-2266 (2017).
12. Wagner, D. L. et al. High prevalence of Streptococcus pyogenes Cas9-reactive T cells within the adult human population. Nat. Med. 25, 242-248 (2019).
13. Wu, X. et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 32, 670-676 (2014).
14. Sack, L. M. et al. Profound tissue specificity in proliferation control underlies cancer drivers and aneuploidy patterns. Cell 173, 499-514 (2018).
15. Yuan, J. et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patien

ts with clinical benefit. Proc. Natl Acad. Sci. USA 105, 20410-20415 (2008).
16. Sommermeyer, D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. Leukemia 30, 492-500 (2016).
17. Fischer, A. M., Katayama, C. D., Pages, G., Pouyssegur, J. & Hedrick, S. M. The role of Erk1 and Erk2 in multiple stages of T cell development. Immunity 23, 431-443 (2005).
18. Lipp, A. M. et al. Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells. PLoS One 9, e85934 (2014).
19. Ma, X. et al. Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors. Nat. Biotechnol. 38, 448-459 (2020).
20. Seo, H. et al. BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. Nat. Immunol. 22, 983-995 (2021).
21. Jamali, A. et al. Highly efficient and selective CAR-gene transfer using CD4- and CD8-targeted lentiviral vectors. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 13, 371-379 (2019).
22. Stoeckius, M. et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. Nat. Methods 14, 865-868 (2017).
23. Mimitou, E. P. et al. Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells. Nat. Methods 16, 409-412 (2019).
24. Gil-Yarom, N. et al. CD74 is a novel transcription regulator. Proc. Natl Acad. Sci. USA 114, 562-567 (2017).
25. Ataide, M. A. et al. BATF3 programs CD8+ T cell memory. Nat. Immunol. 21, 1397-1407 (2020).
26. Katagiri, T., Kameda, H., Nakano, H. & Yamazaki, S. Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB. Immunol. Med. 44, 197-203 (2021).
27. Zhao, X., Shan, Q. & Xue, H.-H. TCF1 in T cell immunity: a broadened frontier. Nat. Rev. Immunol. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00563-6 (2021).
28. Sudhamsu, J. et al. Dimerization of LTβR by LTα1β2 is necessary and sufficient for signal transduction. Proc. Natl Acad. Sc

i USA 110, 19896-19901 (2013).
29. Li, C. et al. Structurally distinct recognition motifs in lymphotoxin-β receptor and CD40 for tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-mediated signaling. J. Biol. Chem. 278, 50523-50529 (2003).
30. Wu, M.-Y., Wang, P.-Y., Han, S.-H. & Hsieh, S.-L. The cytoplasmic domain of the lymphotoxin-β receptor mediates cell death in HeLa cells. J. Biol. Chem. 274, 11868-11873 (1999).
31. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nat. Rev. Immunol. 5, 472-484 (2005).
32. Dejardin, E. et al. The lymphotoxin-β receptor induces different patterns of gene expression via two NF-κB pathways. Immunity 17, 525-535 (2002).
33. Saoulli, K. et al. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. J. Exp. Med. 187, 1849-1862 (1998).
34. Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. T cell dysfunction in cancer. Cancer Cell 33, 547-562 (2018).
35. Roth, T. L. et al. Pooled knockin targeting for genome engineering of cellular immunotherapies. Cell 181, 728-744 (2020).
36. VanArsdale, T. L. et al. Lymphotoxin- receptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor B. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 2460-2465 (1997).
37. Yilmaz, Z. B. et al. Quantitative dissection and modeling of the NF-κB p100-p105 module reveals interdependent precursor proteolysis. Cell Rep. 9, 1756-1769 (2014).
38. Hu, B. et al. Augmentation of antitumor immunity by human and mouse CAR T cells secreting IL-18. Cell Rep. 20, 3025-3033 (2017).
39. Yeku, O. O., Purdon, T. J., Koneru, M., Spriggs, D. & Brentjens, R. J. Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment. Sci. Rep. 7, 10541 (2017).
40. Lynn, R. C. et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resista

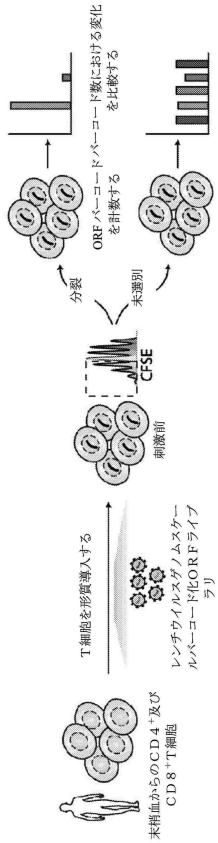
ｎｃｅ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６，２９３－３００（２０１９）．
４１．Ｓｃｈｍｉｅｄｅｌ，Ｂ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｐａｃｔ　ｏｆ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍｓ　ｏｎ　ｈｕｍａｎ　ｉｍｍｕｎｅ　ｃｅｌｌ　ｇｅｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ．Ｃｅｌｌ　１７５，１７０１－１７１５（２０１８）．

【０２６１】

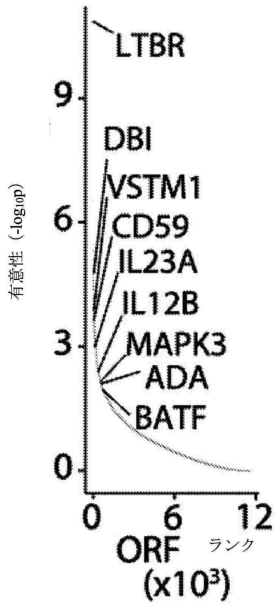
本明細書に引用される全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。２０２１年６月３０日に出願された米国仮特許出願第６３／２１７，０１４号、２０２１年１２月８日に出願された米国仮特許出願第６３／２８７，３８９号、及び２０２２年３月１５日に出願された米国仮特許出願第６３／３２０，１０１号は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、特定の実施形態を参照して説明されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されるであろう。かかる修正は、添付の実施形態の範囲内に含まれることが意図される。

【図面】

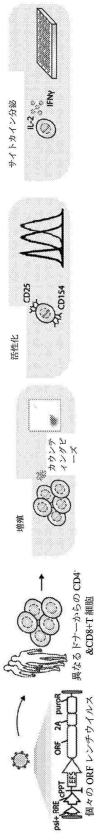
【図１Ａ】



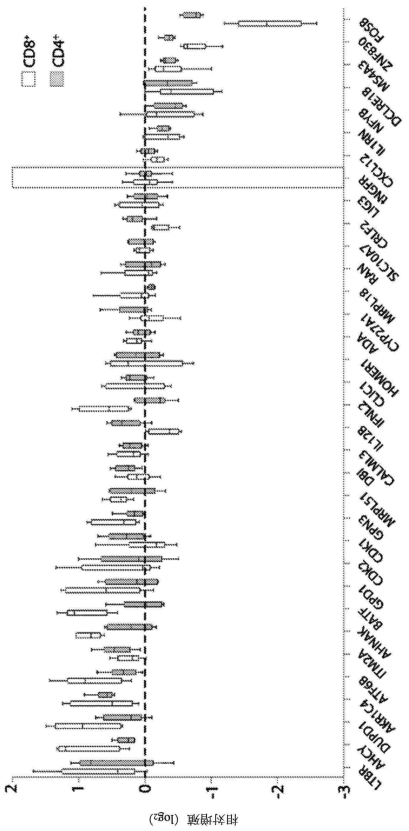
【図１Ｂ】



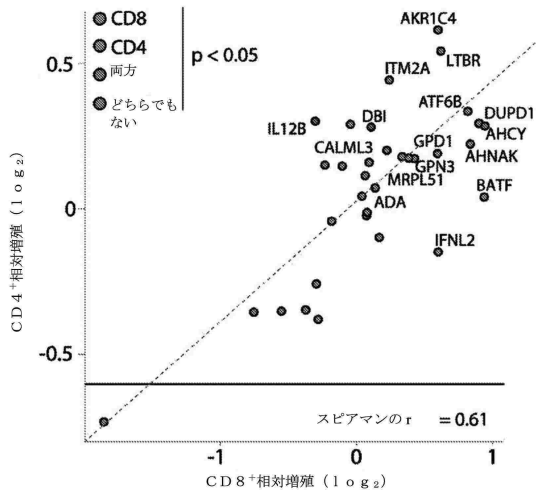
【図２Ａ】



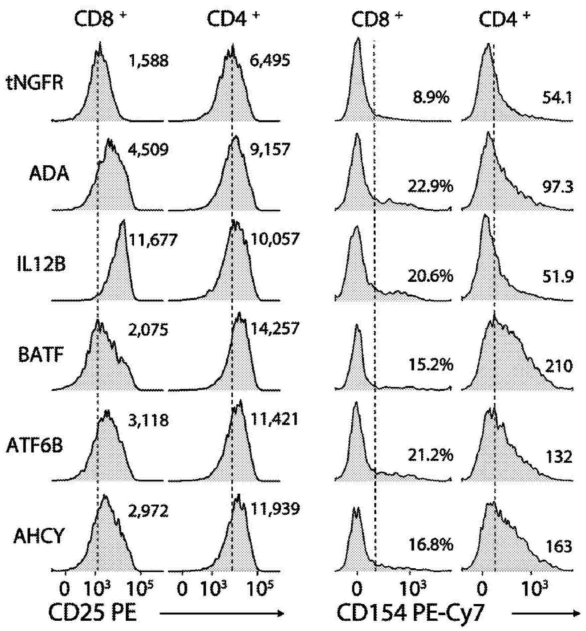
【図２Ｂ】



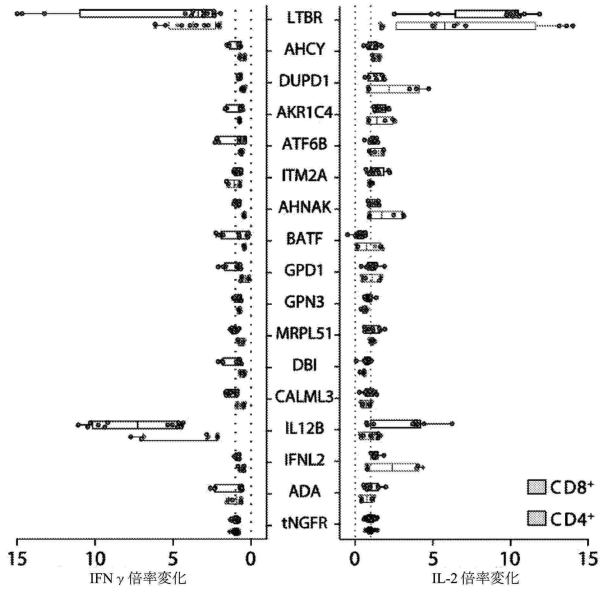
【図２Ｃ】



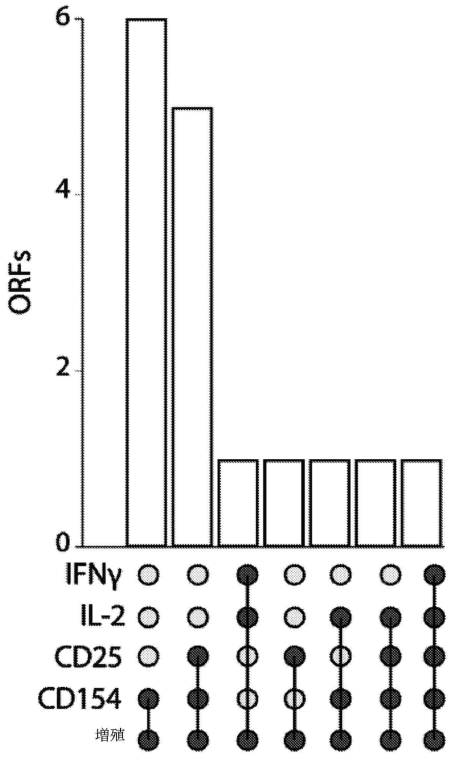
【図２Ｄ】



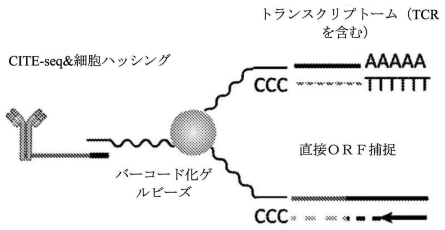
【図２Ｅ】



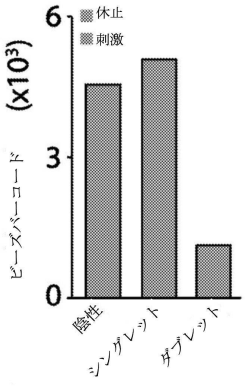
【図２Ｆ】



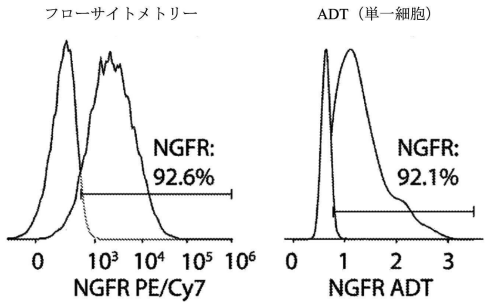
【図３Ａ】



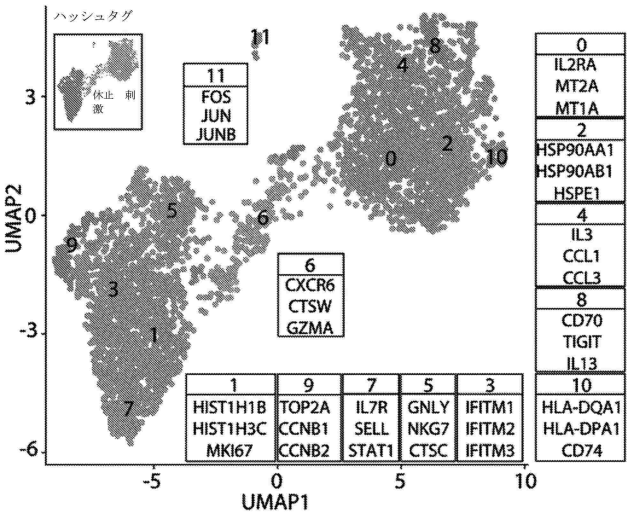
【図３Ｂ】



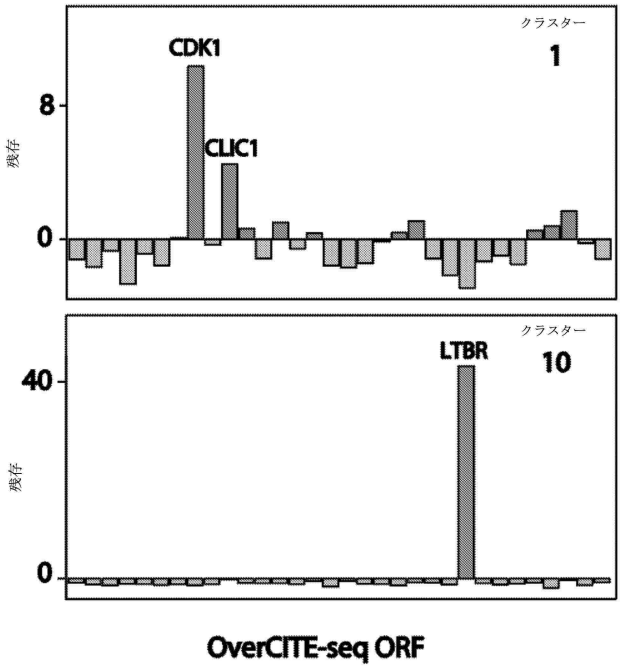
【図３Ｃ】



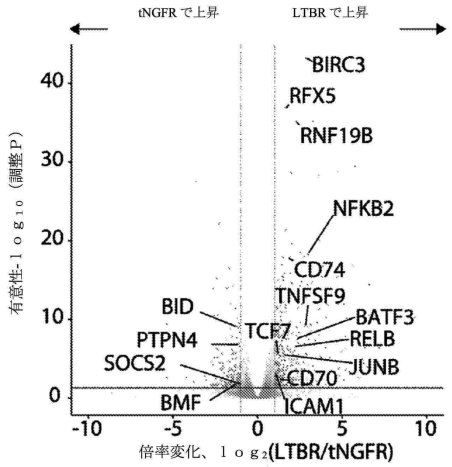
【図３Ｄ】



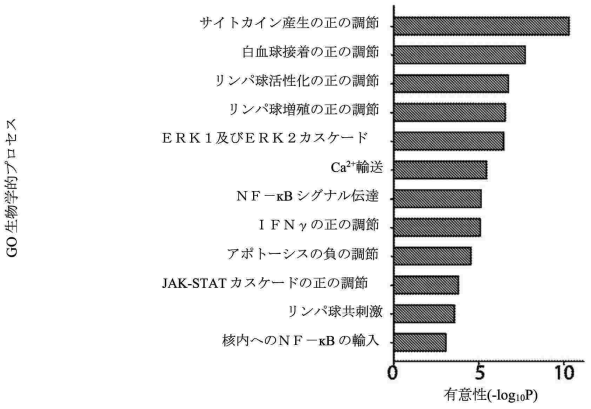
【図３Ｅ】



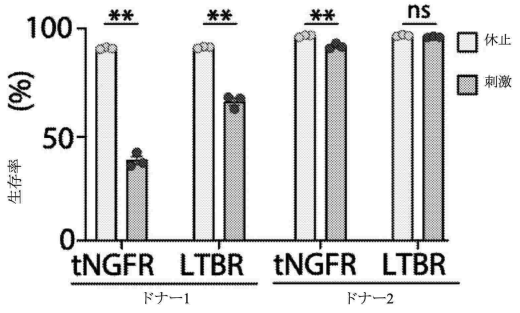
【図４Ａ】



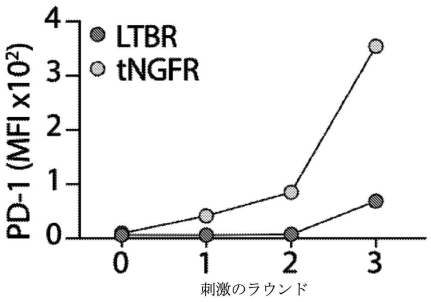
【図４Ｂ】



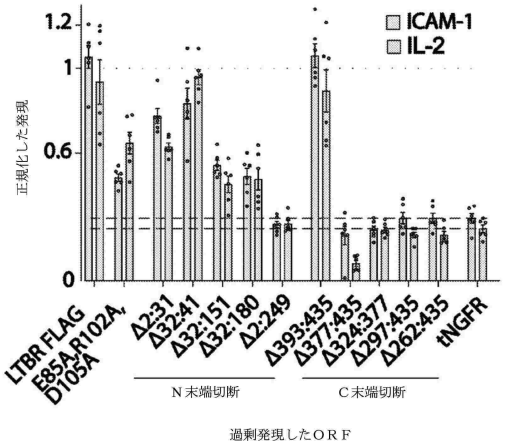
【図４Ｃ】



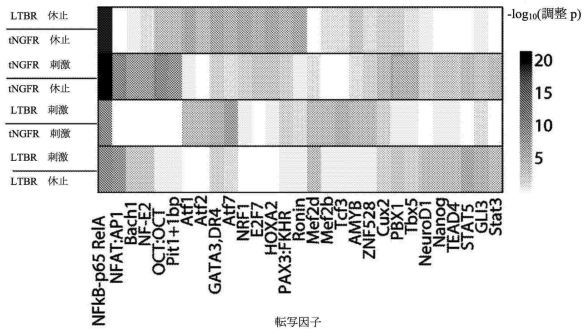
【図４Ｄ】



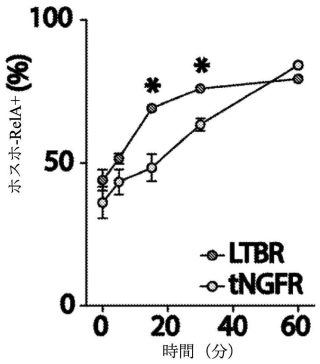
【図４Ｅ】



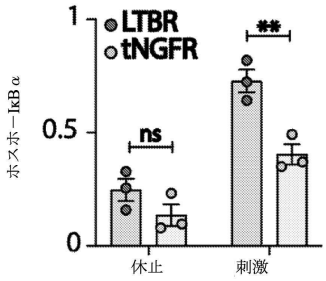
【図４Ｆ】



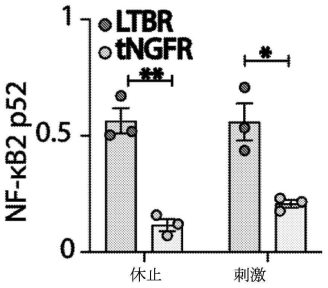
【図４Ｇ】



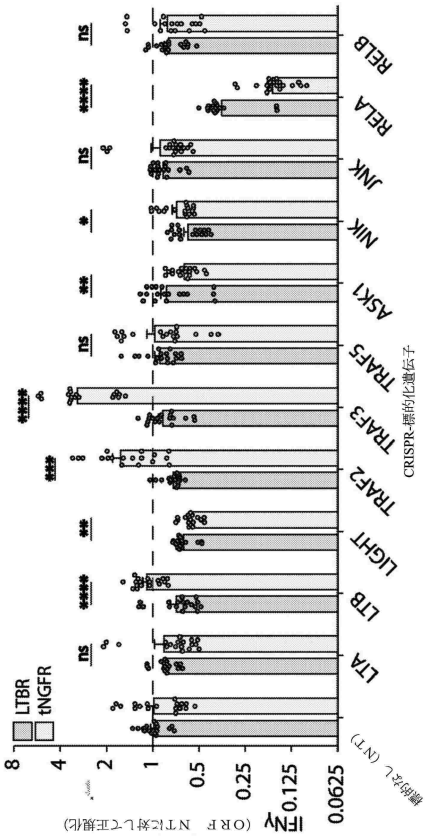
【図４Ｈ】



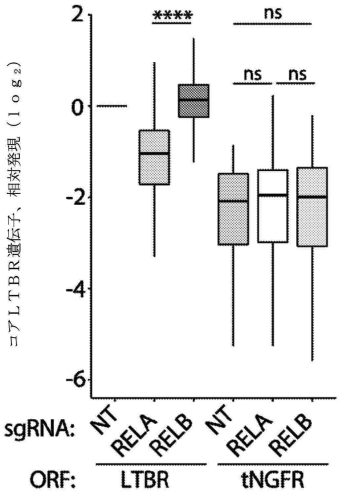
【図４Ｉ】



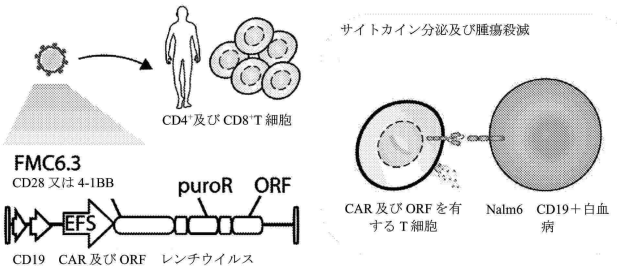
【図４Ｊ】



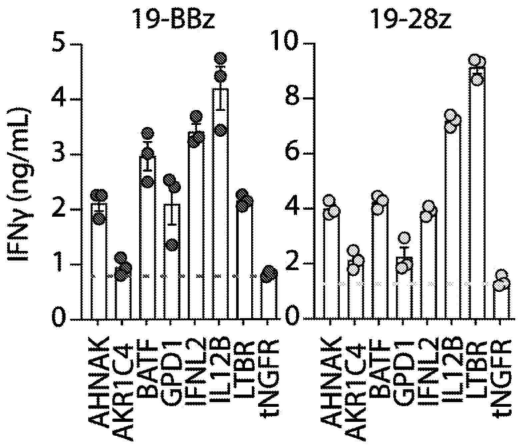
【図４Ｋ】



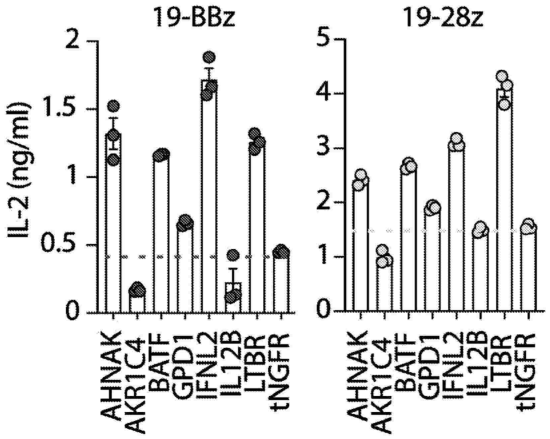
【図５Ａ】



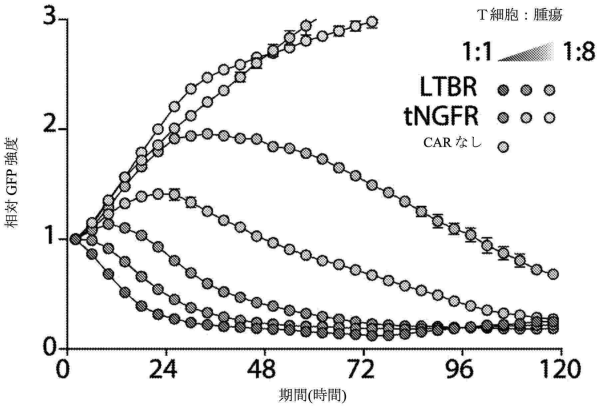
【図５Ｂ】



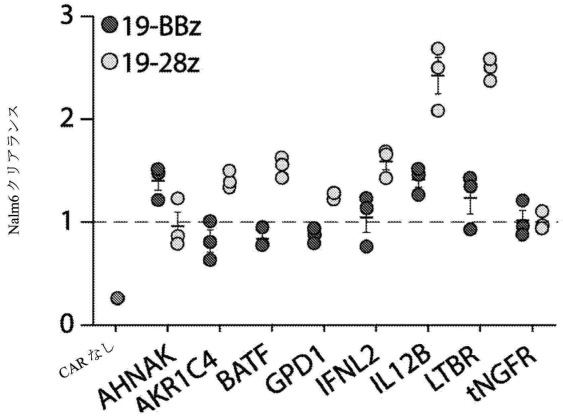
【図５Ｃ】



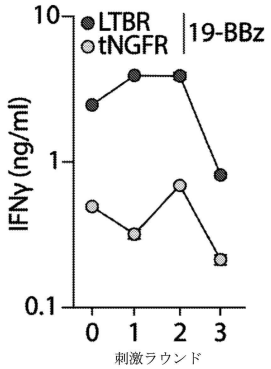
【図５Ｄ】



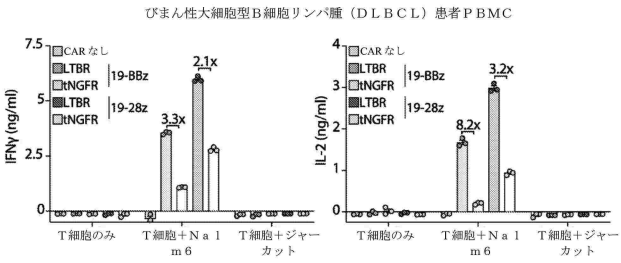
【図５Ｅ】



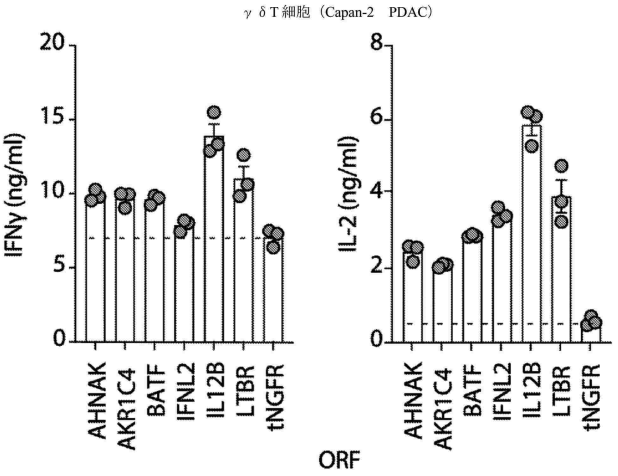
【図５Ｆ】



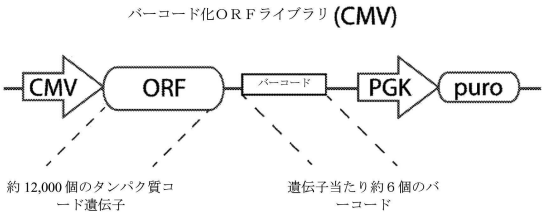
【図５Ｇ】



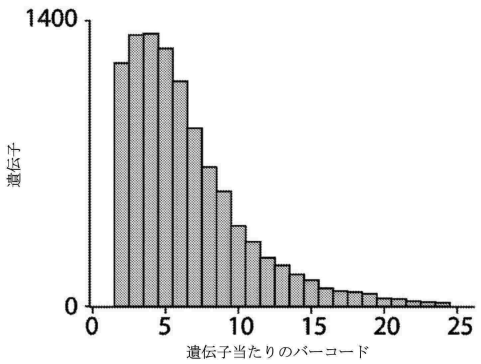
【図５Ｈ】



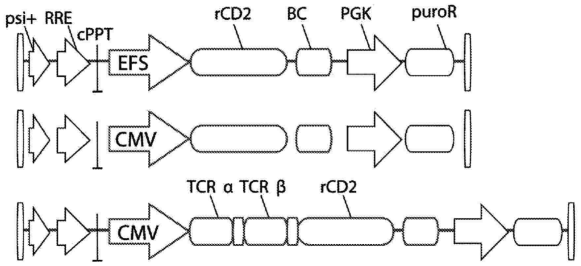
【図６Ａ】



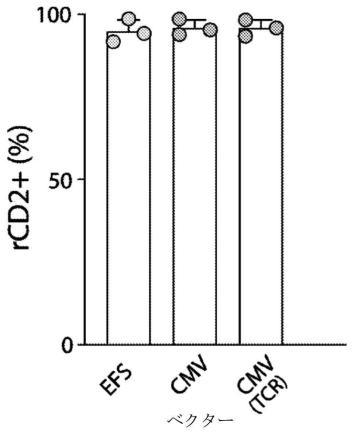
【図６Ｂ】



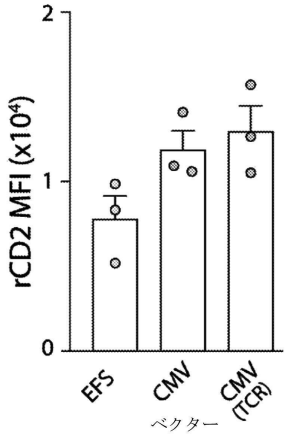
【図６Ｃ】



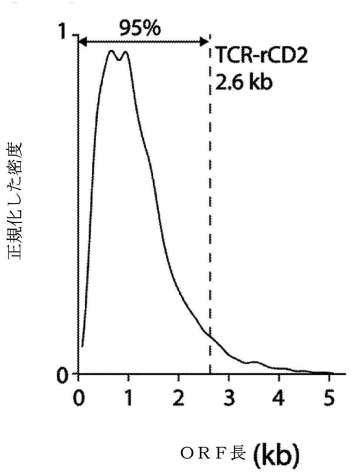
【図６Ｄ】



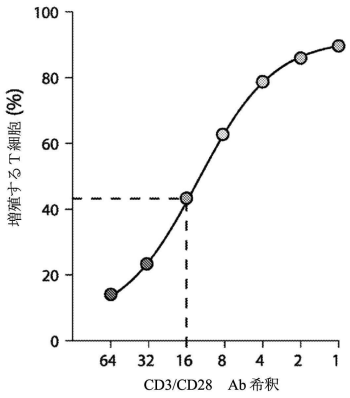
【図６Ｅ】



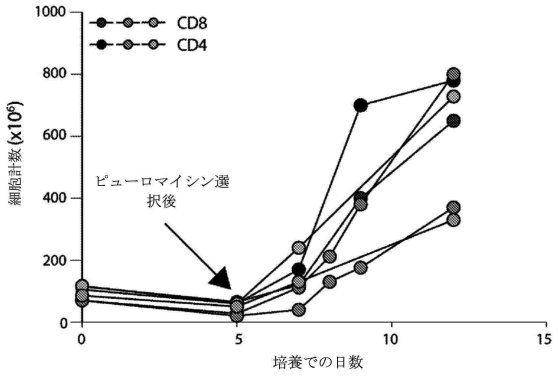
【図６Ｆ】



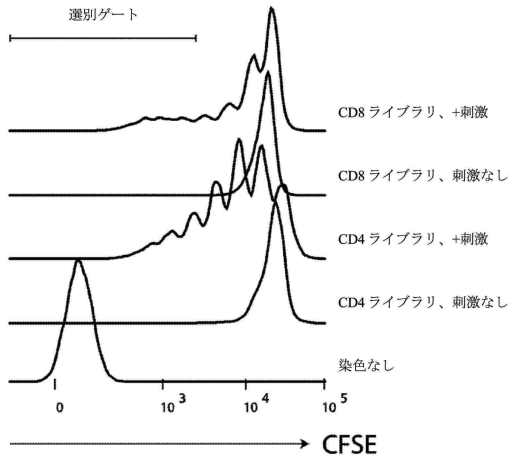
【図６Ｇ】



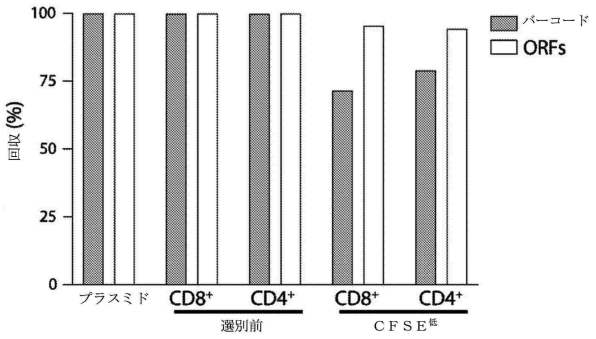
【図６Ｈ】



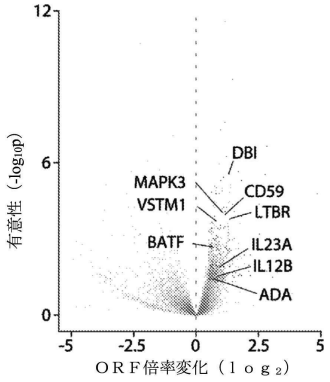
【図６Ｉ】



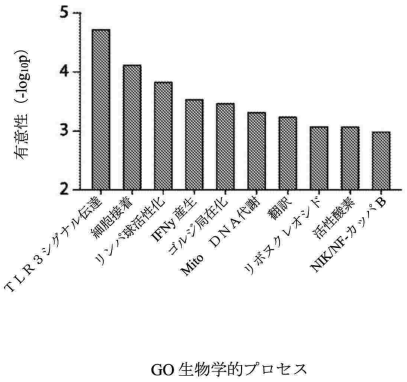
【図６Ｊ】



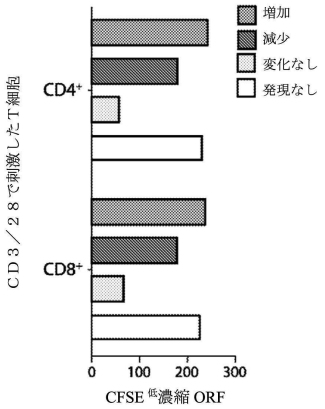
【図６Ｋ】



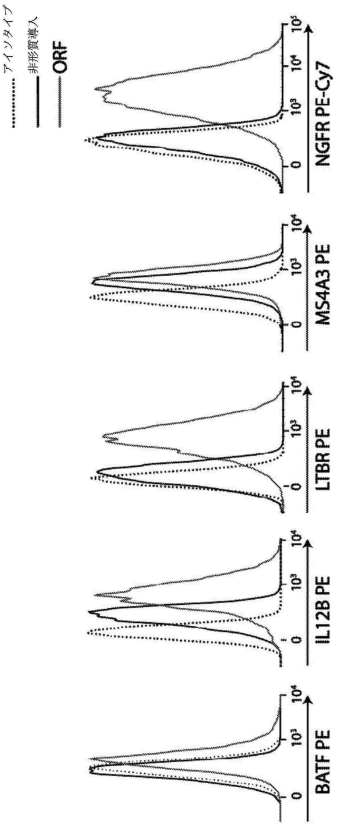
【図６Ｌ】



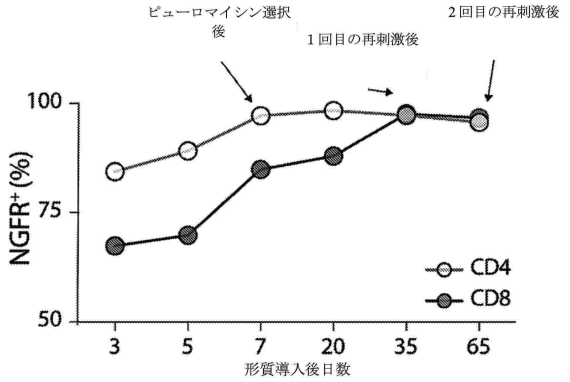
【図６Ｍ】



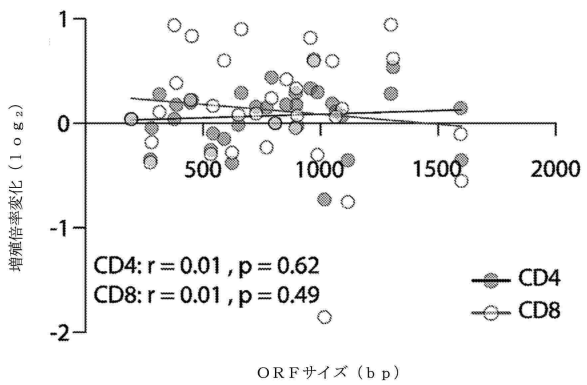
【図７Ａ】



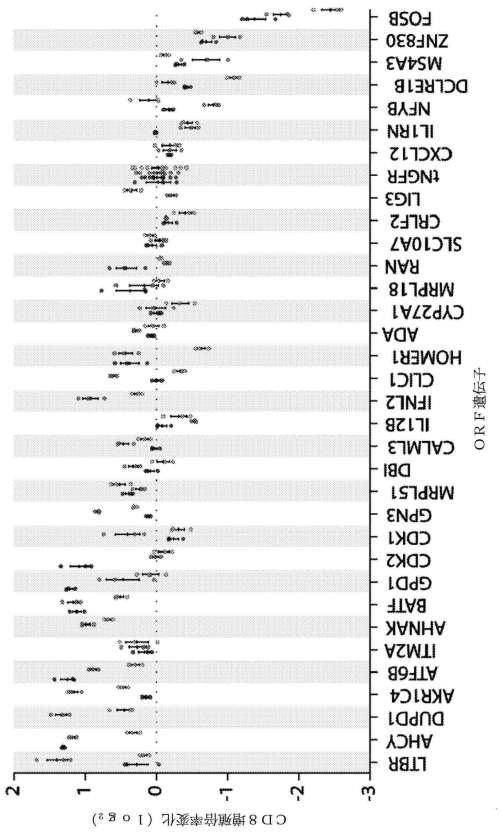
【図７Ｂ】



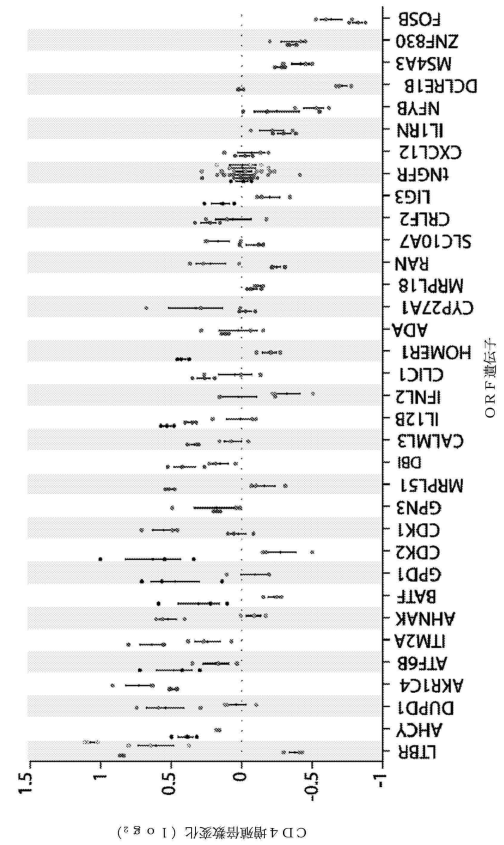
【図７Ｃ】



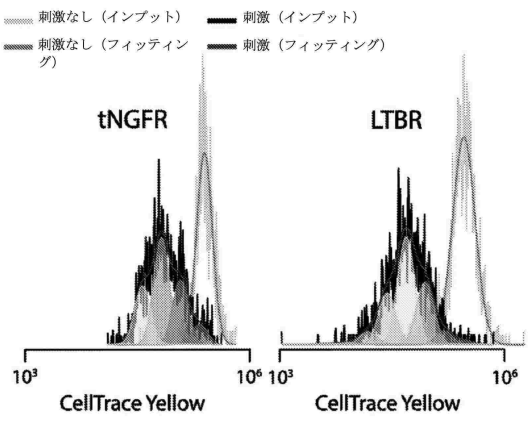
【図７Ｄ】



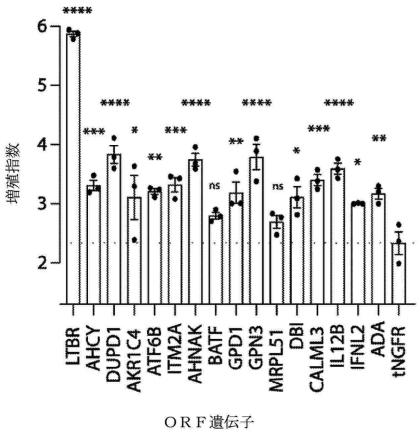
【図７Ｅ】



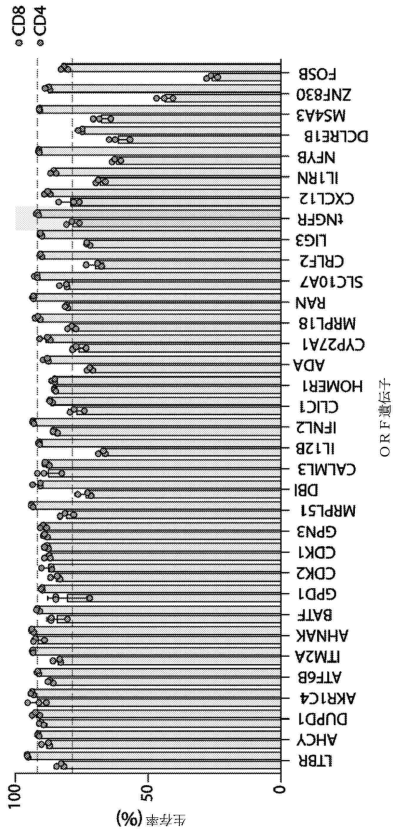
【図７Ｆ】



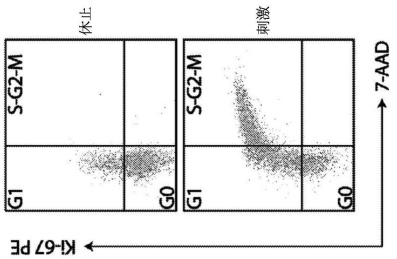
【図７Ｇ】



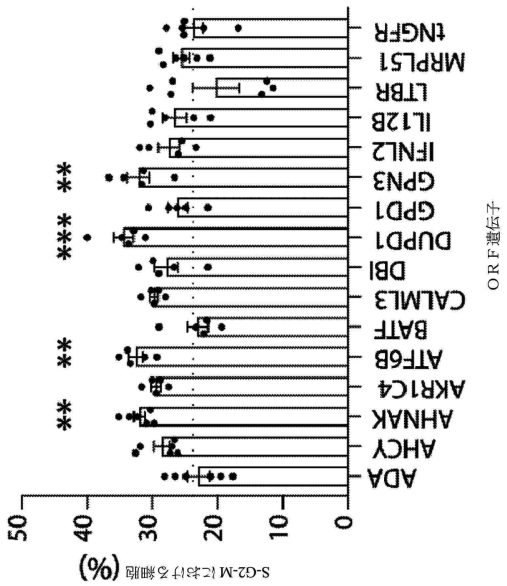
【図７Ｈ】



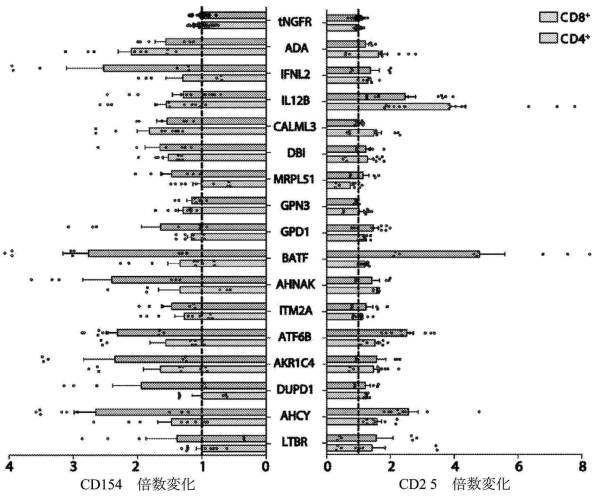
【図７Ｉ】



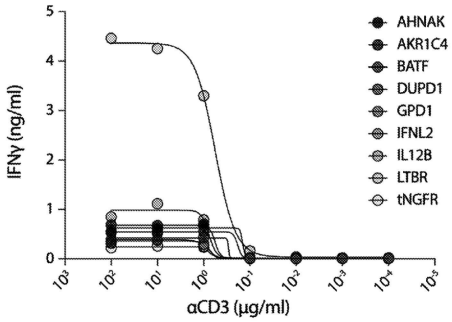
【図７Ｊ】



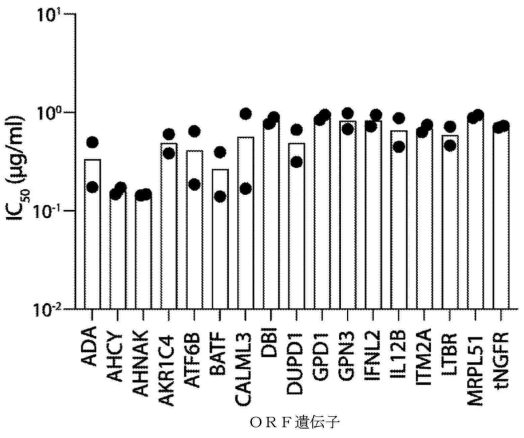
【図８Ａ】



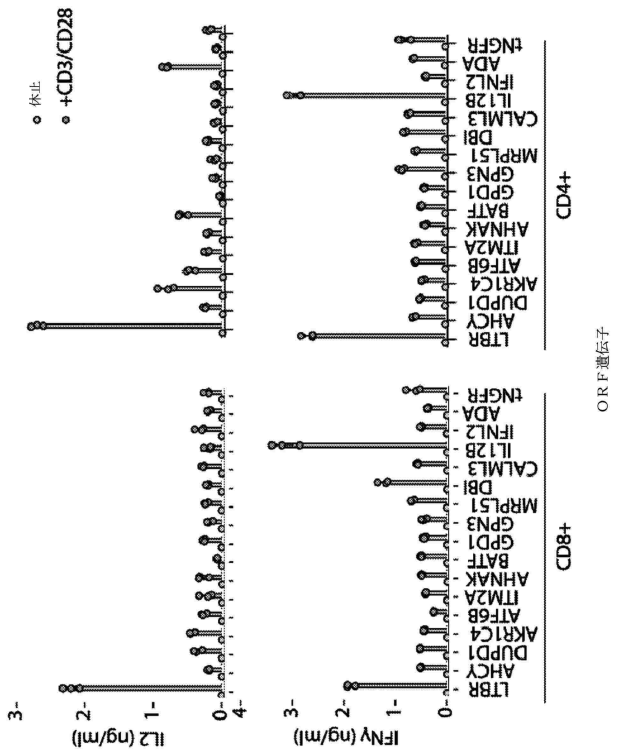
【図８Ｂ】



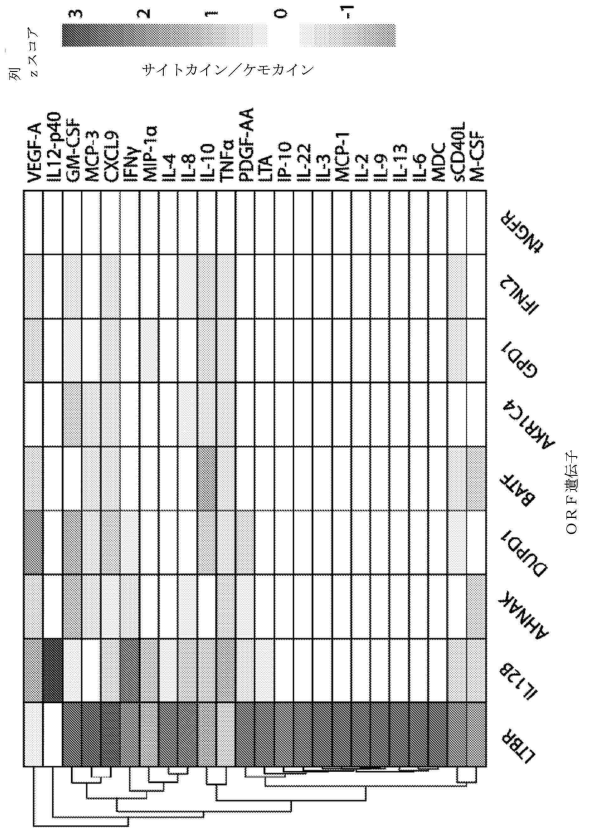
【図８Ｃ】



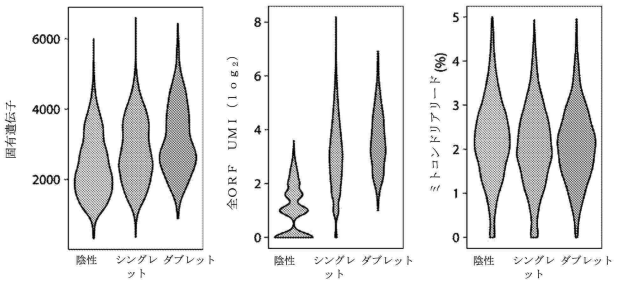
【図８Ｄ】



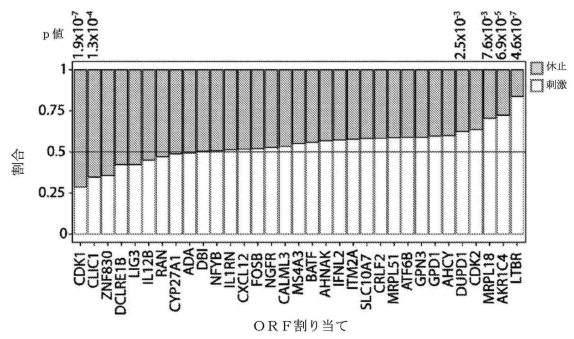
【図８Ｅ】



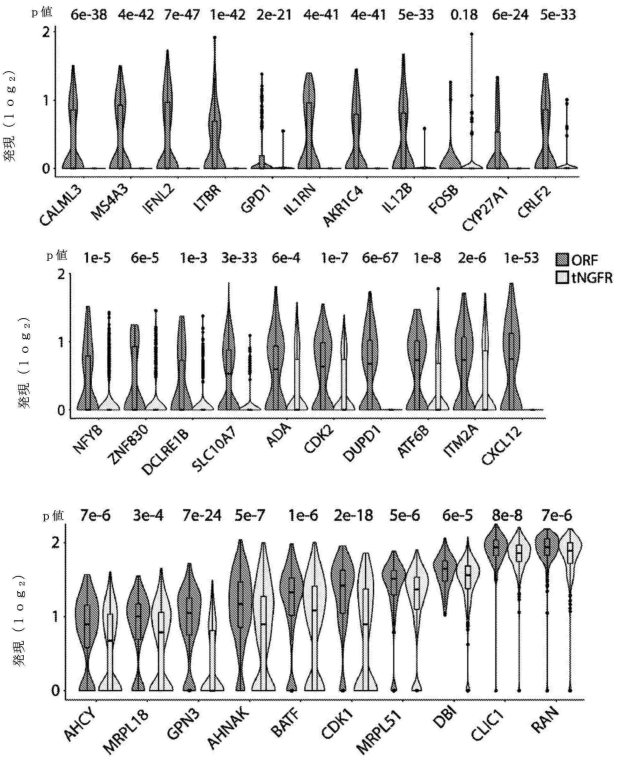
【図９Ａ】



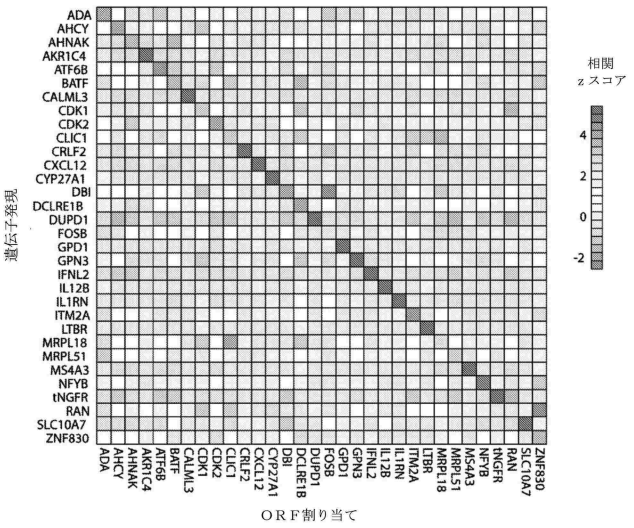
【図９Ｂ】



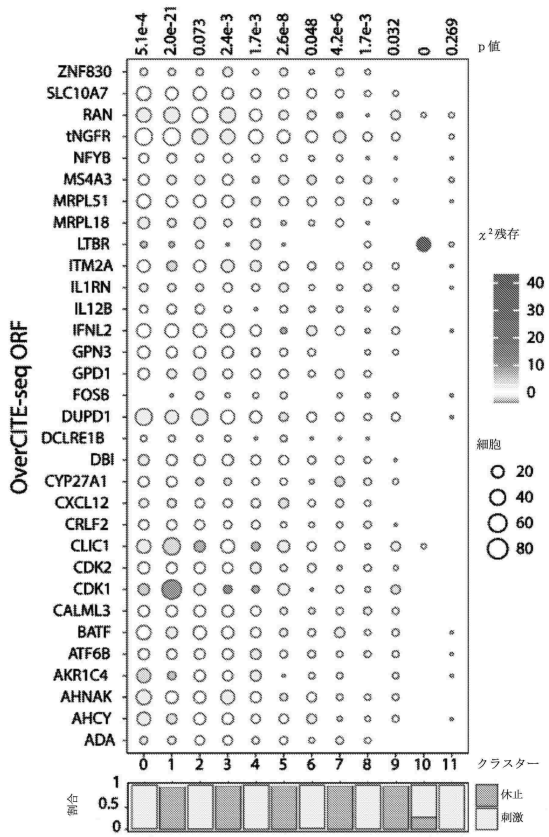
【図９Ｃ】



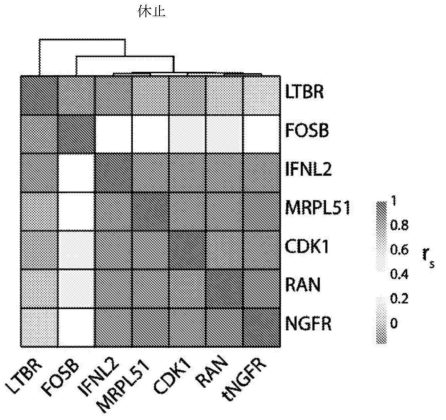
【図９Ｄ】



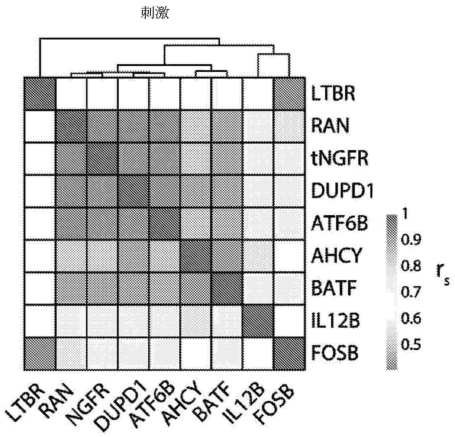
【図９Ｅ】



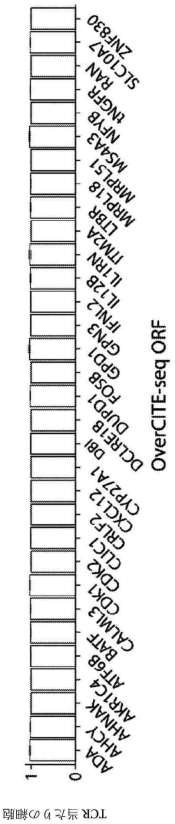
【図９Ｆ】



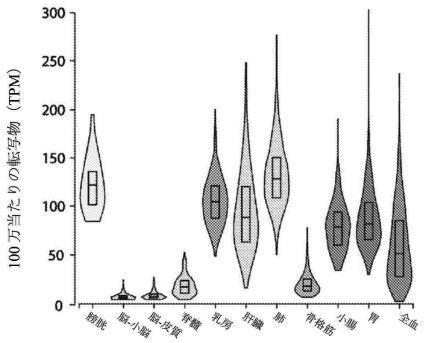
【図９Ｇ】



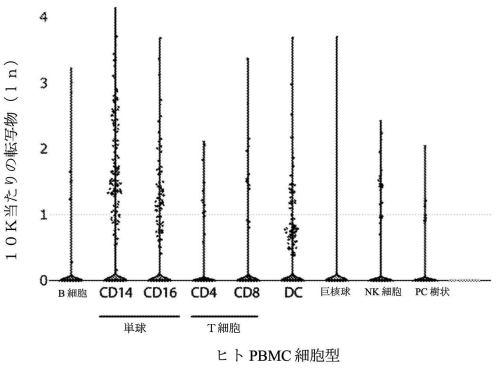
【図９Ｈ】



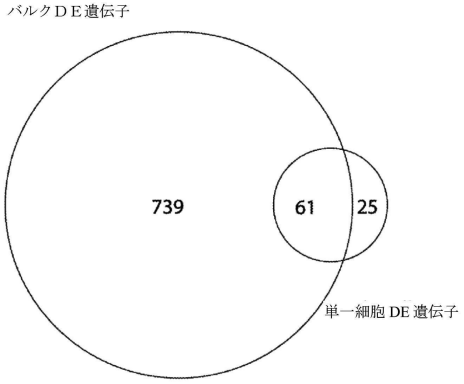
【図１０Ａ】



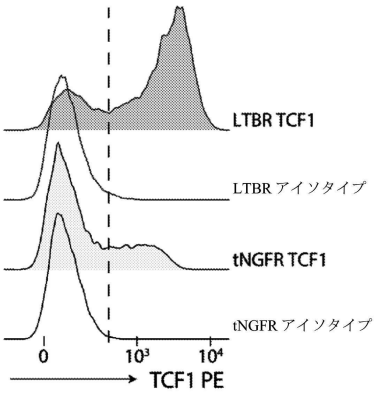
【図１０Ｂ】



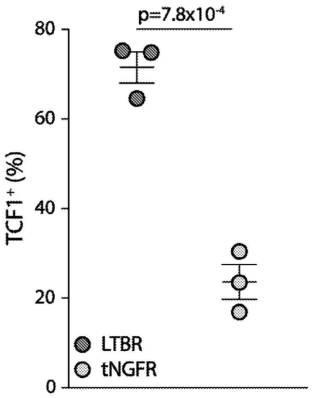
【図１０Ｃ】



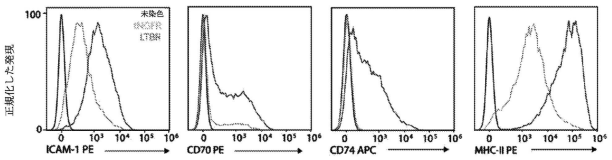
【図１０Ｄ】



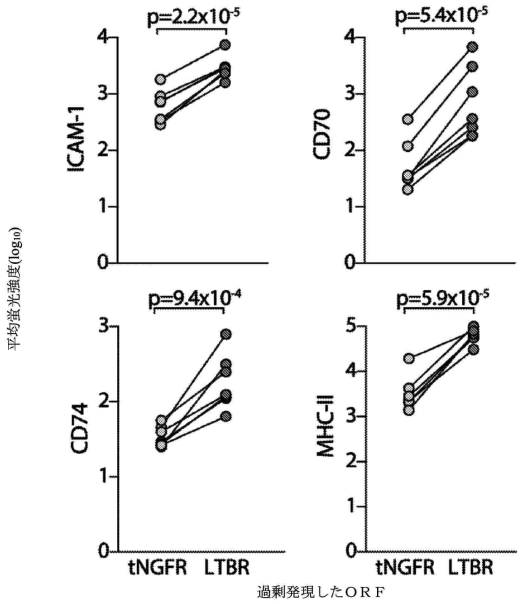
【図１０Ｅ】



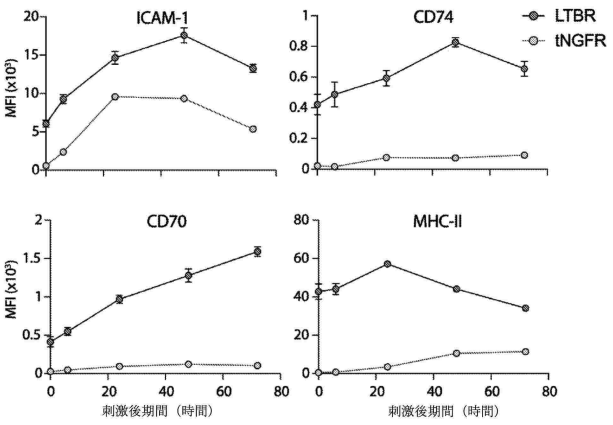
【図１０Ｆ】



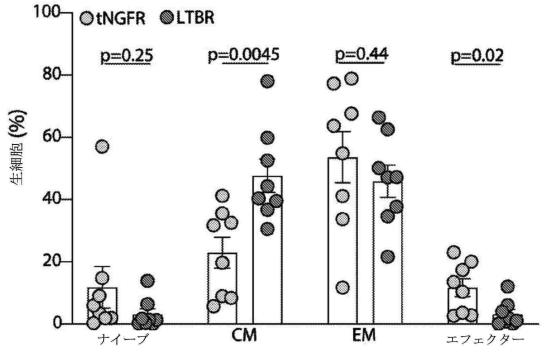
【図１０Ｇ】



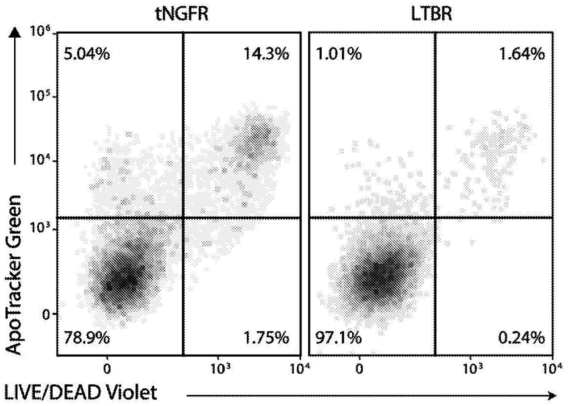
【図１０Ｈ】



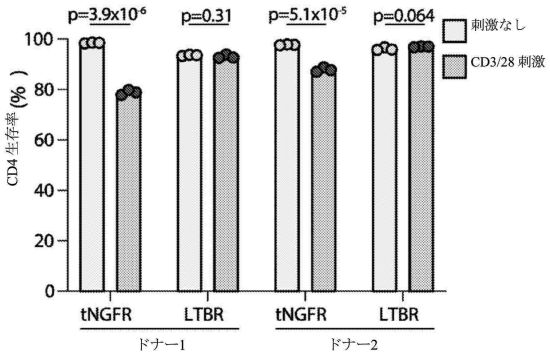
【図１０Ｉ】



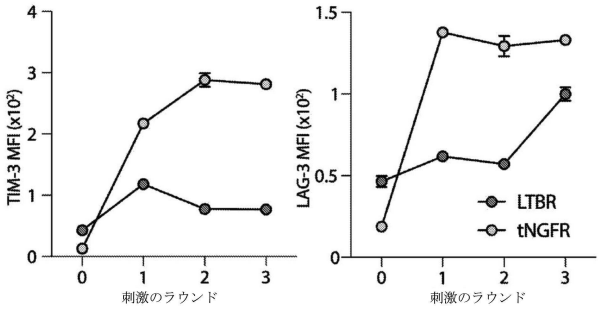
【図１０Ｊ】



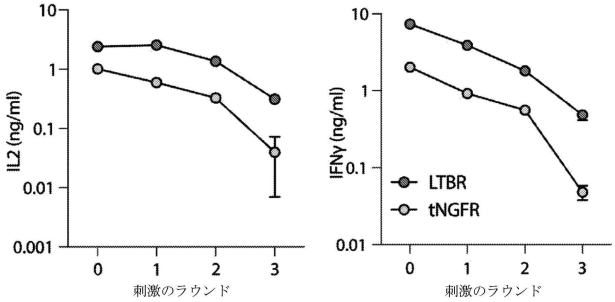
【図１０Ｋ】



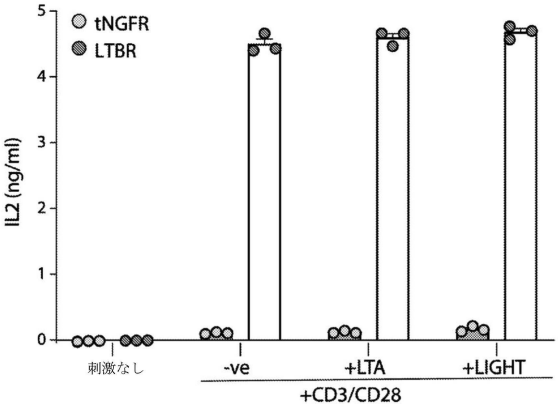
【図１０Ｌ】



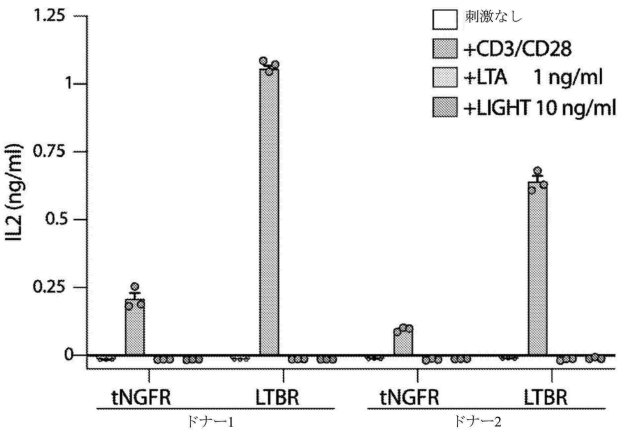
【図１０Ｍ】



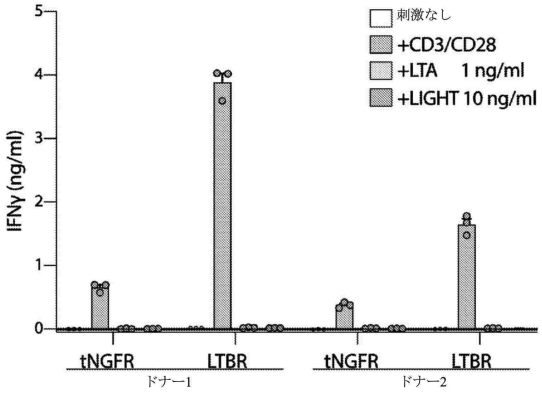
【図１１Ａ】



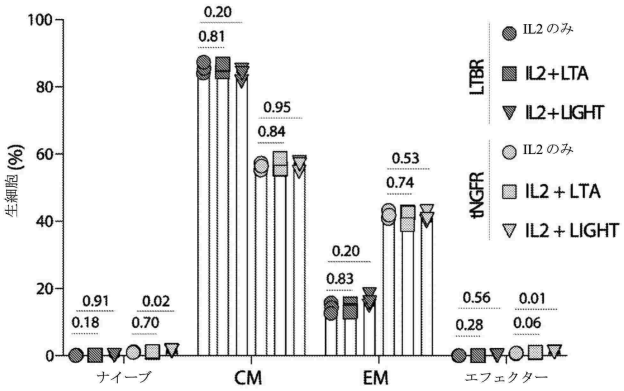
【図１１Ｂ】



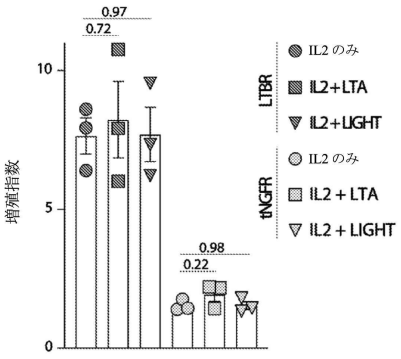
【図１１Ｃ】



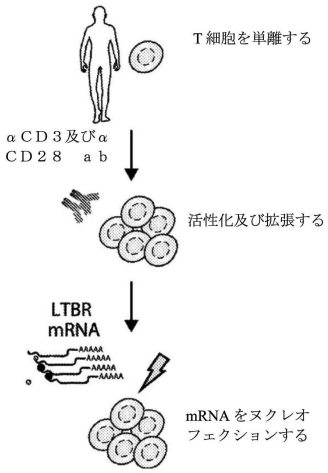
【図１１Ｄ】



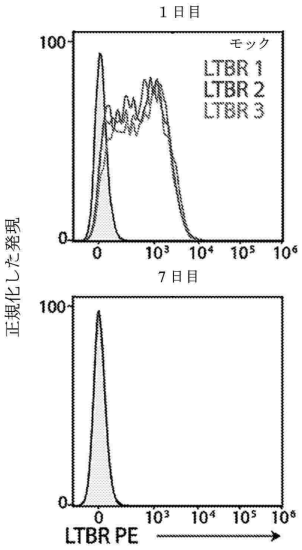
【図１１Ｅ】



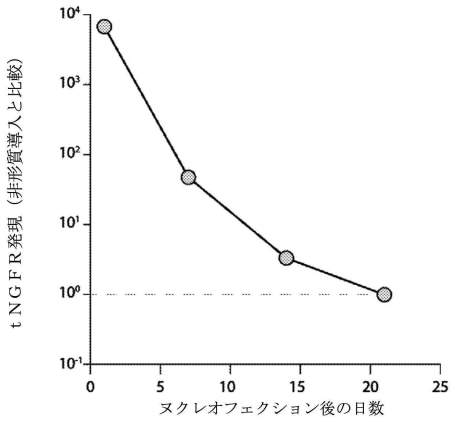
【図１１Ｆ】



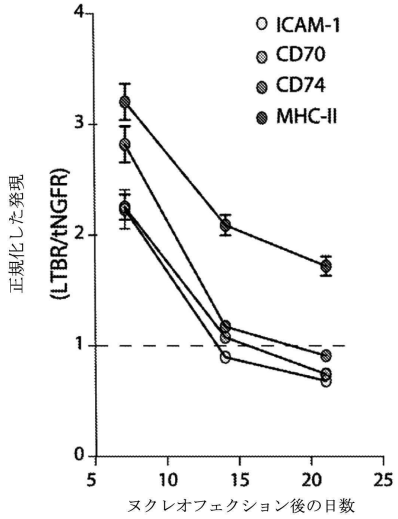
【図１１Ｇ】



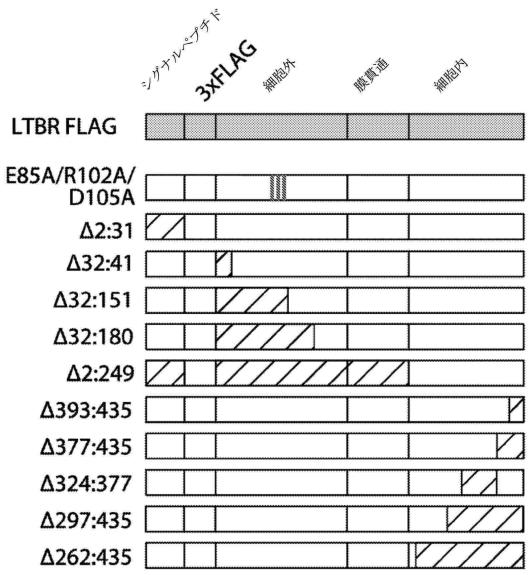
【図１１Ｈ】



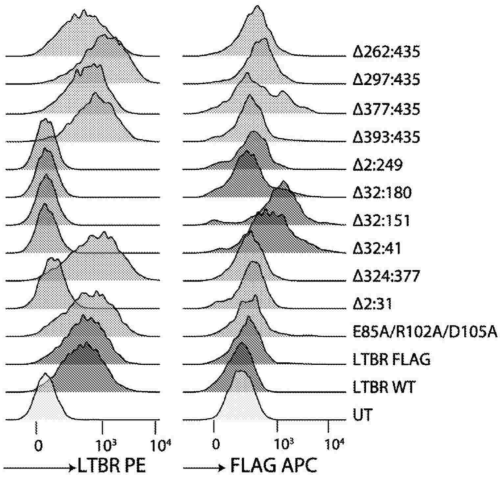
【図１１Ｉ】



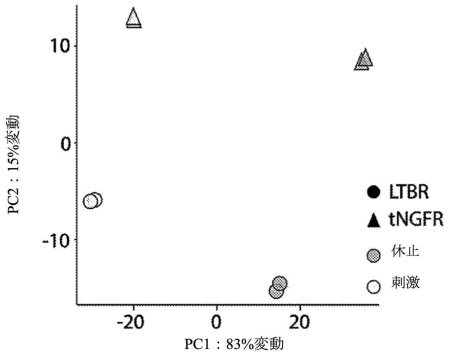
【図１１Ｊ】



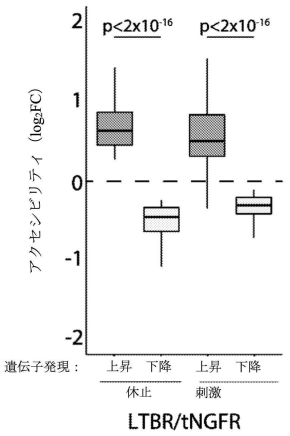
【図１１Ｋ】



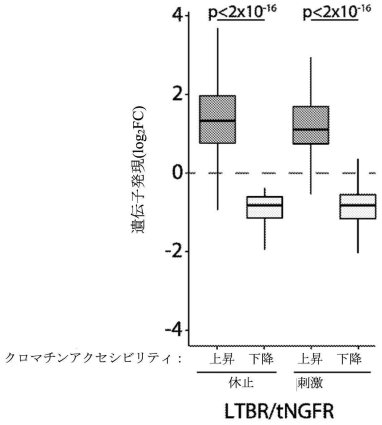
【図１２Ａ】



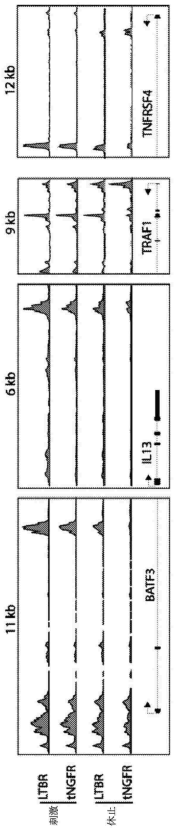
【図１２Ｂ】



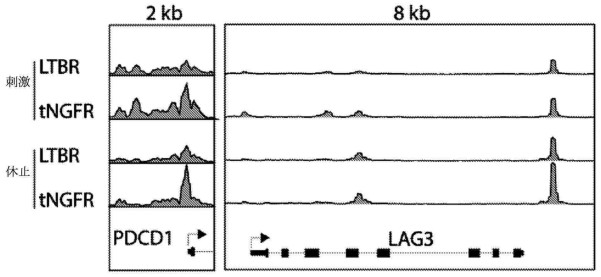
【図１２Ｃ】



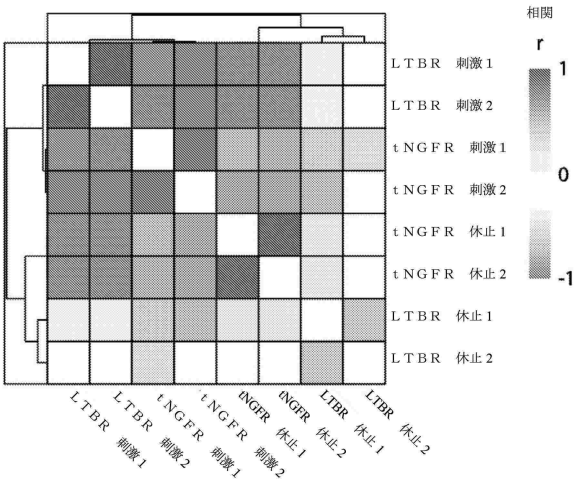
【図１２Ｄ】



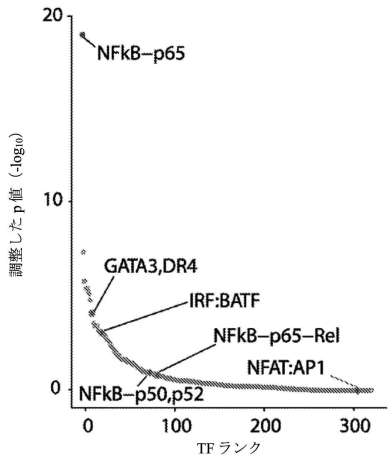
【図１２Ｅ】



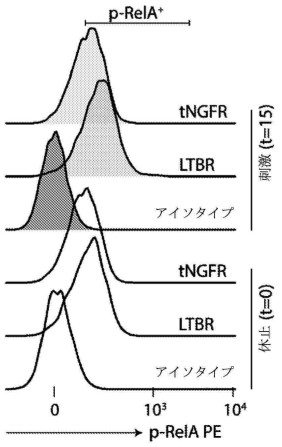
【図１２Ｆ】



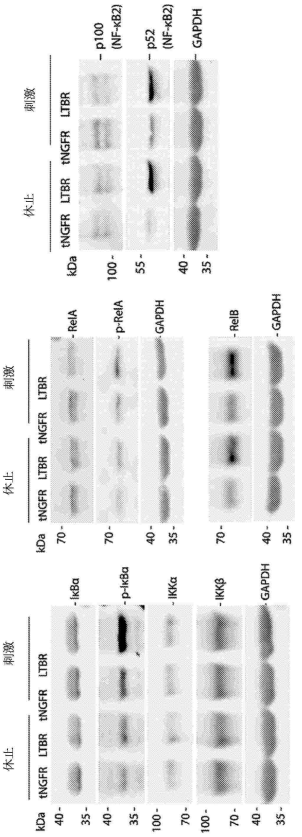
【図１２Ｇ】



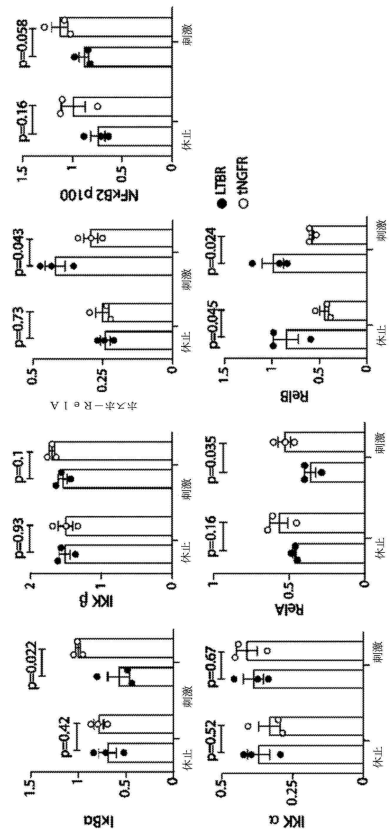
【図１３Ａ】



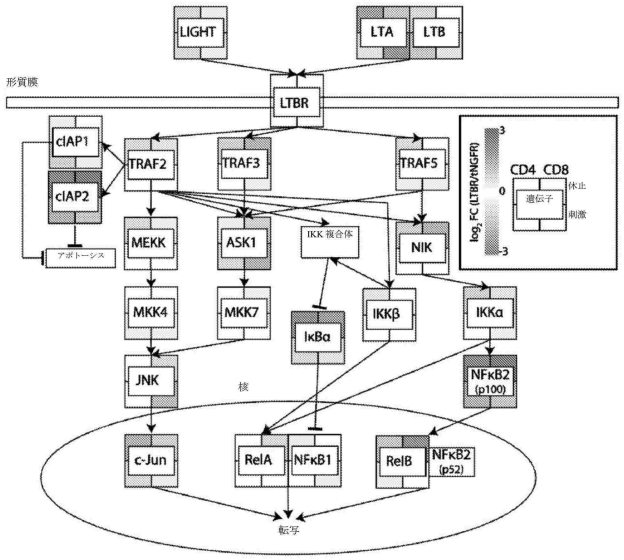
【図１３Ｂ】



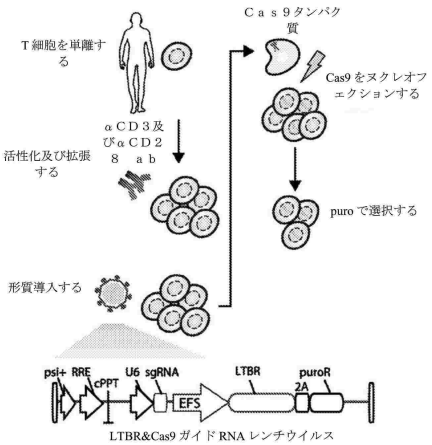
【図１３Ｃ】



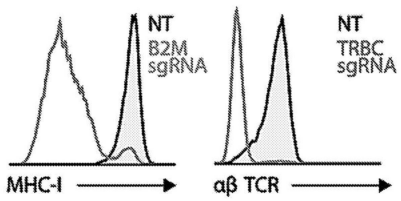
【図１３Ｄ】



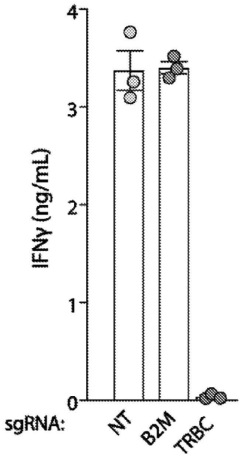
【図１３Ｅ】



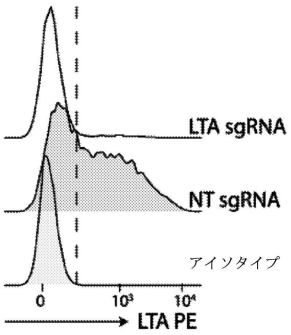
【図１３Ｆ】



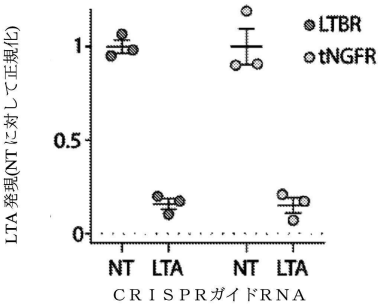
【図１３Ｇ】



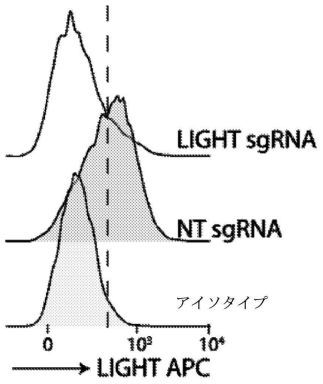
【図１３Ｈ】



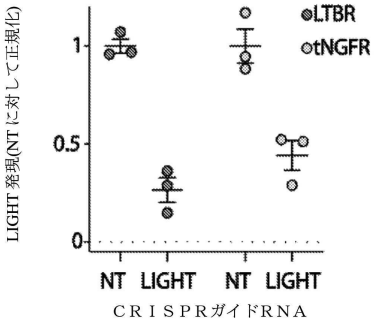
【図１３Ｉ】



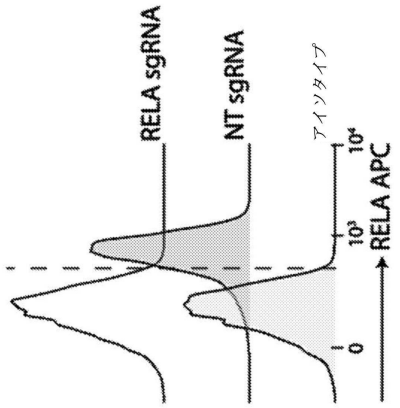
【図１３Ｊ】



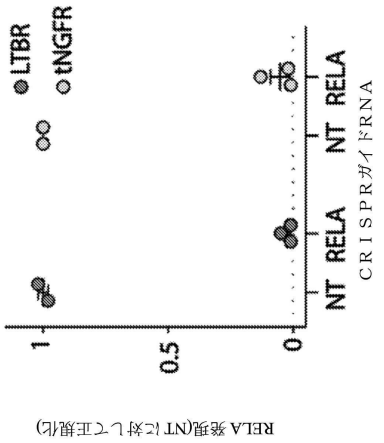
【図１３Ｋ】



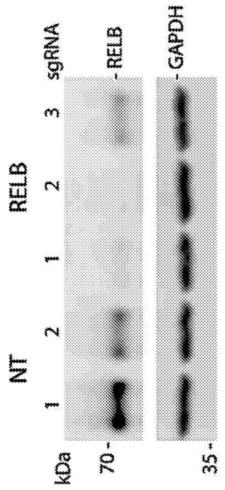
【図１３Ｌ】



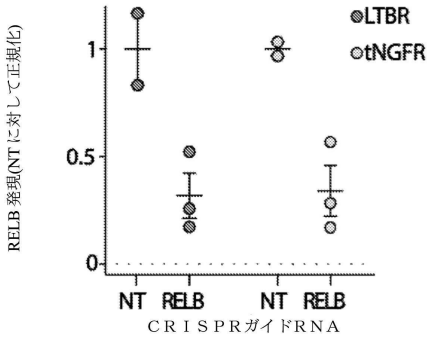
【図１３Ｍ】



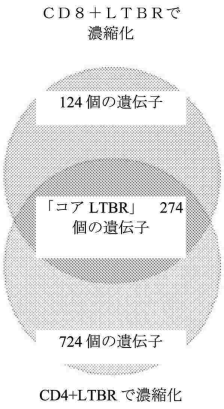
【図１３Ｎ】



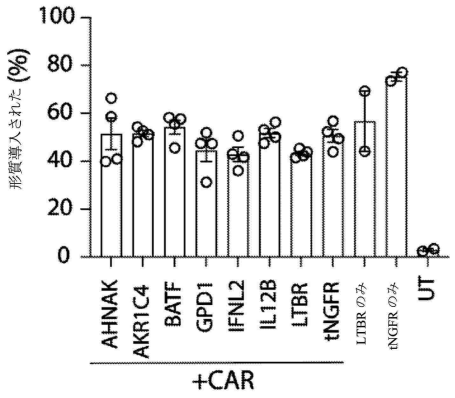
【図１３Ｏ】



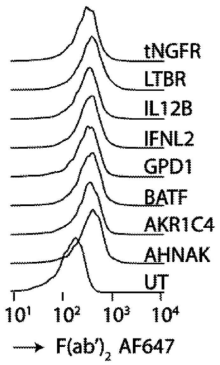
【図１３Ｐ】



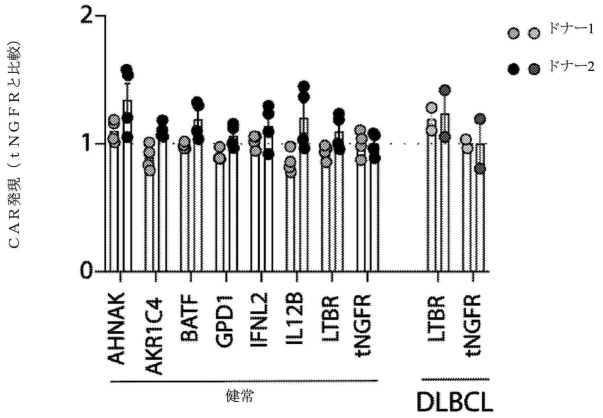
【図１４Ａ】



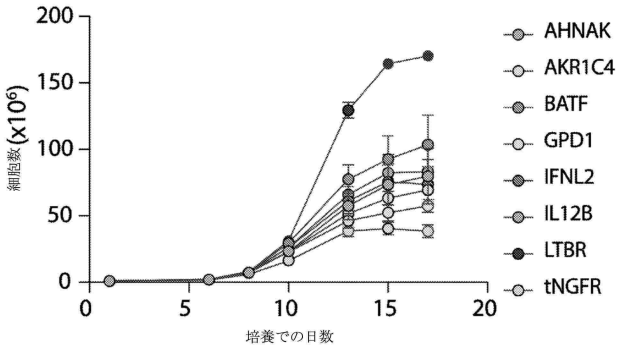
【図１４Ｂ】



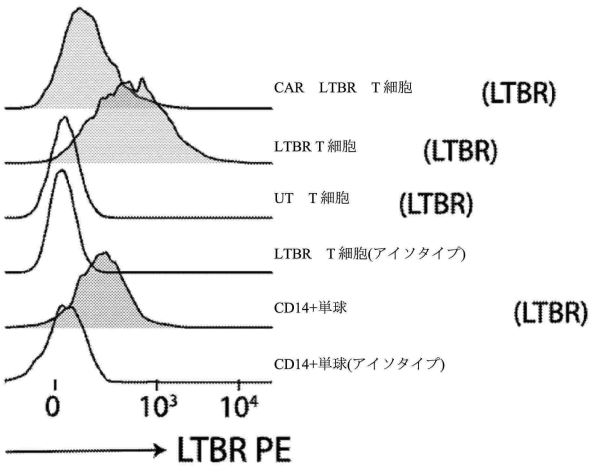
【図１４Ｃ】



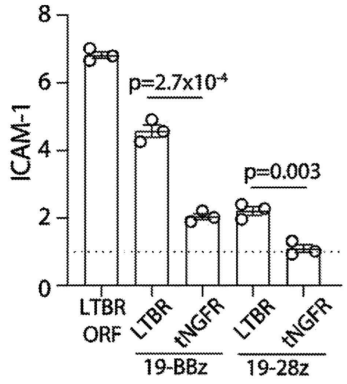
【図１４Ｄ】



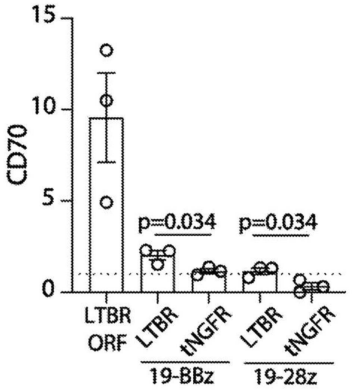
【図１４Ｅ】



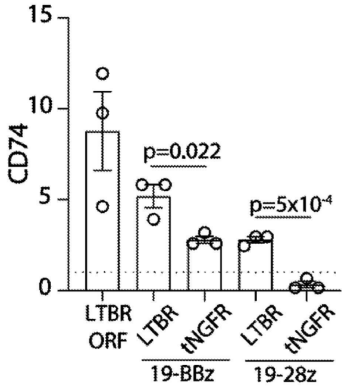
【図１４Ｆ】



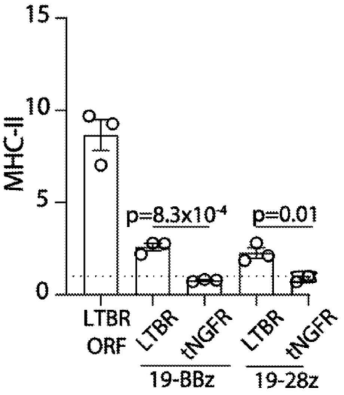
【図１４Ｇ】



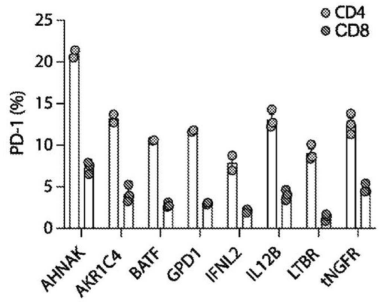
【図１４Ｈ】



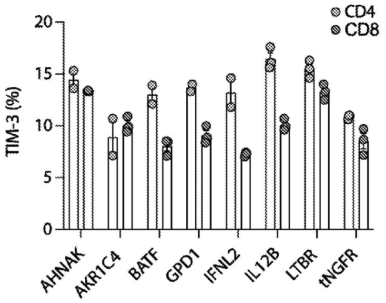
【図１４Ｉ】



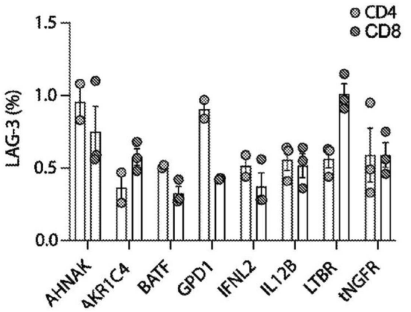
【図１４Ｊ】



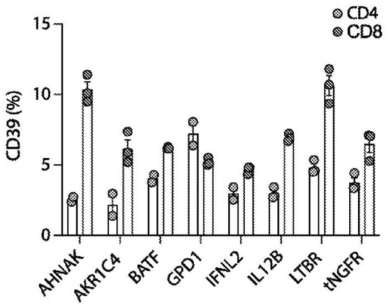
【図１４Ｋ】



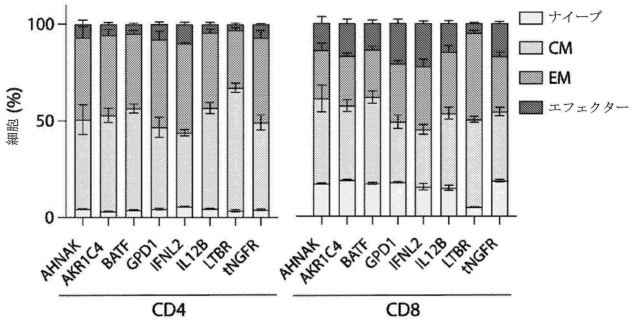
【図１４Ｌ】



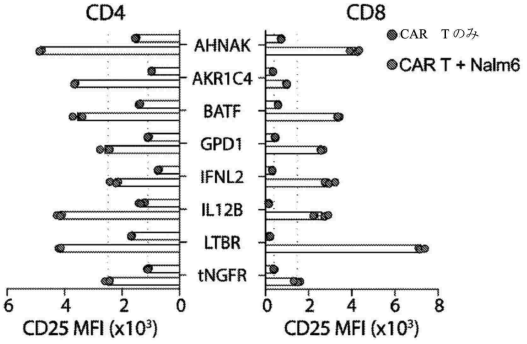
【図１４Ｍ】



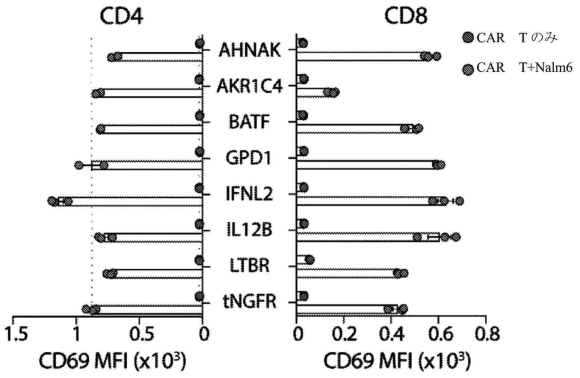
【図１４Ｎ】



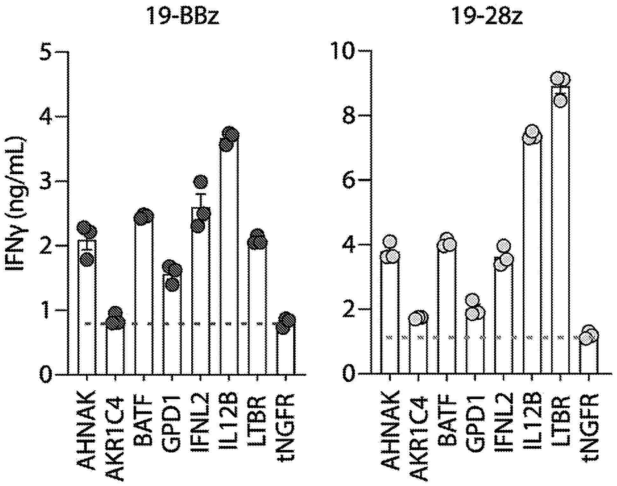
【図１４Ｏ】



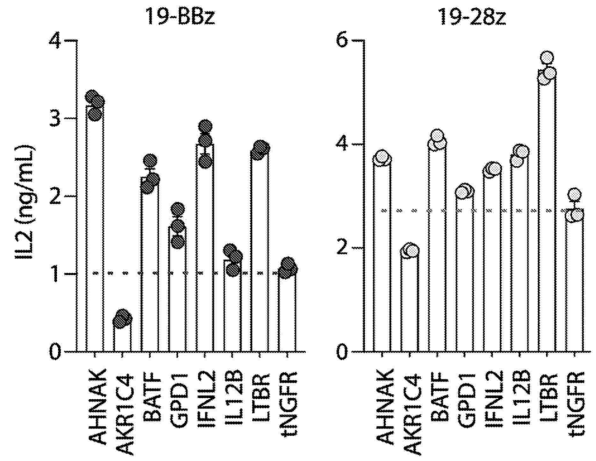
【図１４Ｐ】



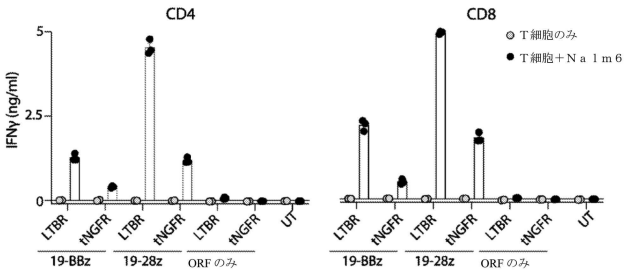
【図１５Ａ】



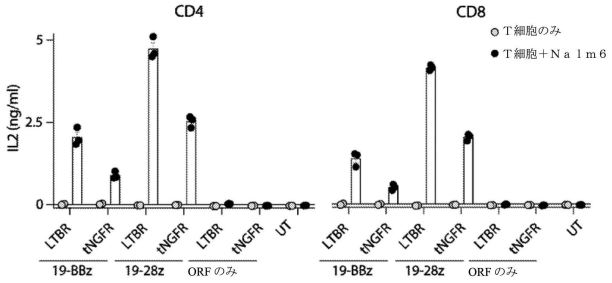
【図１５Ｂ】



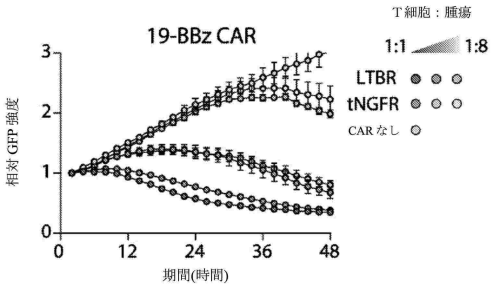
【図１５Ｃ】



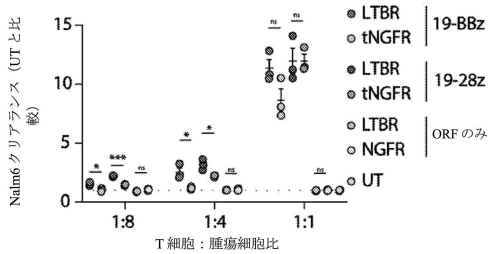
【図１５Ｄ】



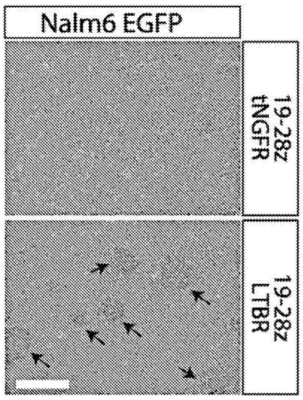
【図１５Ｅ】



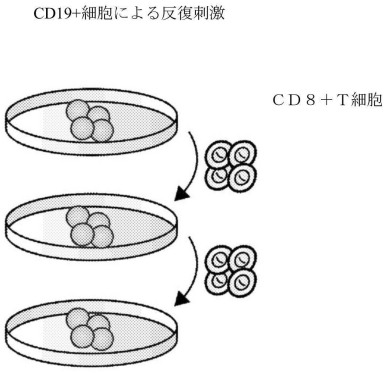
【図１５Ｆ】



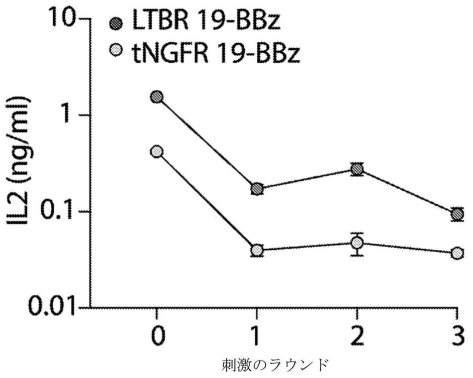
【図１５Ｇ】



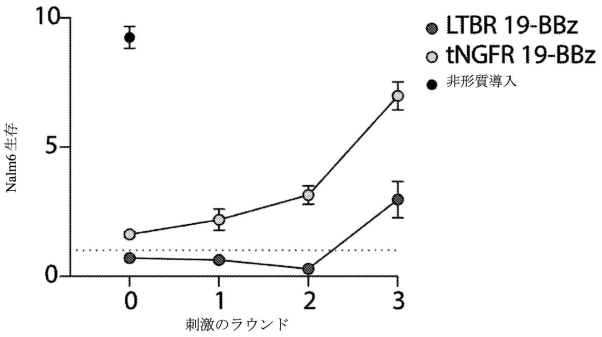
【図１５Ｈ】



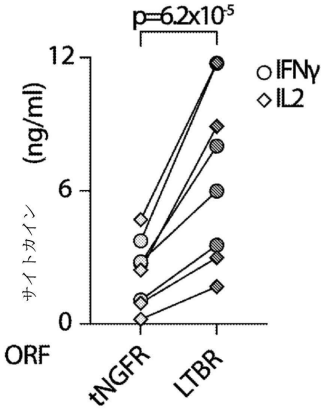
【図１５Ｉ】



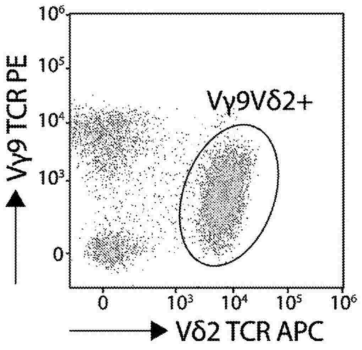
【図１５Ｊ】



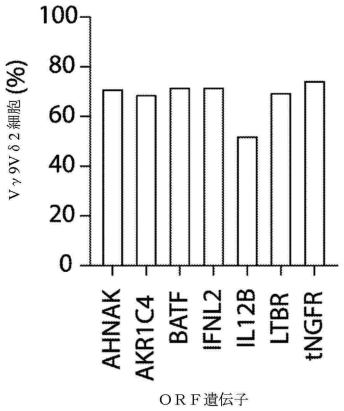
【図１５Ｋ】



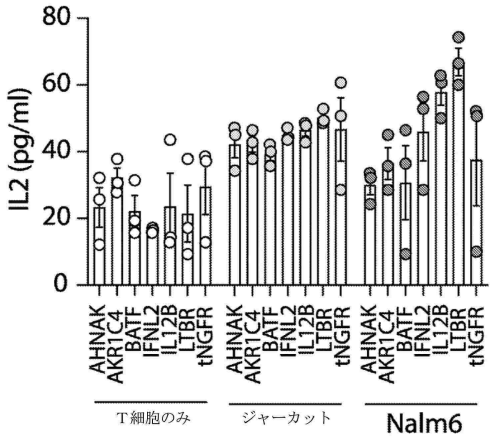
【図１５Ｌ】



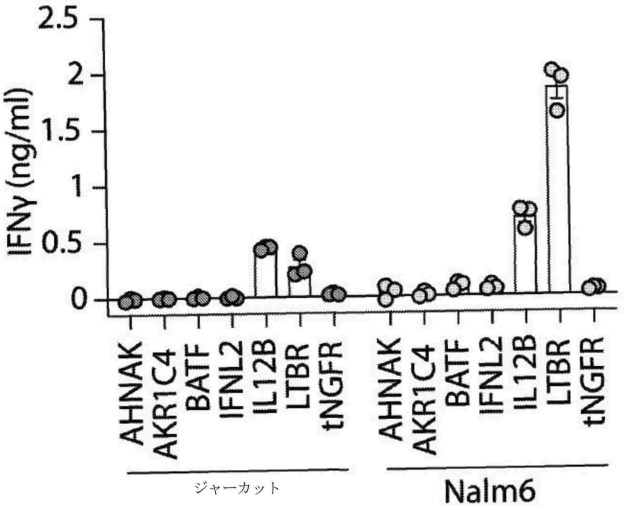
【図１５Ｍ】



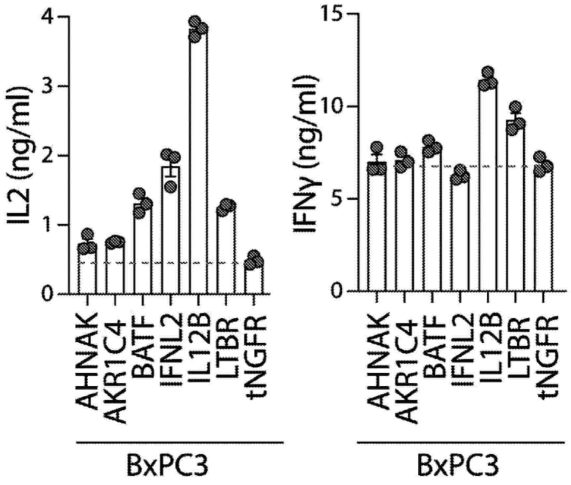
【図１５Ｎ】



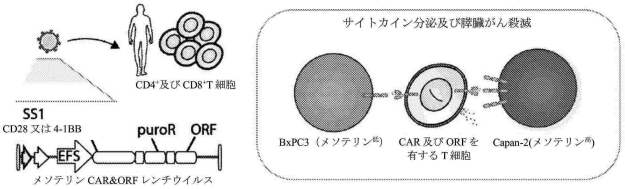
【図１５Ｏ】



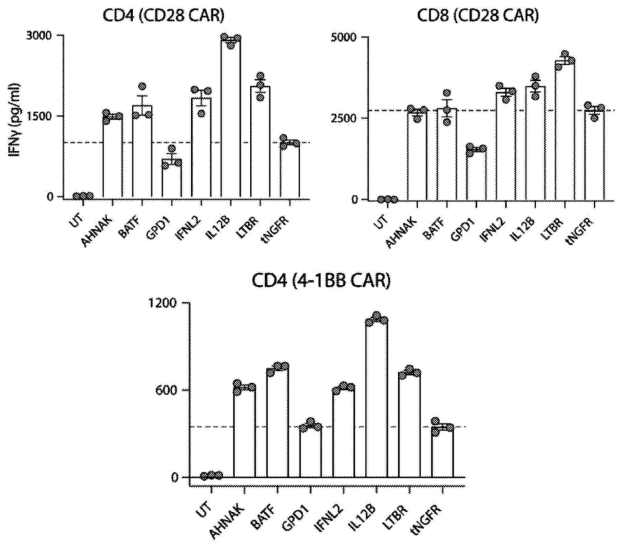
【図１５Ｐ】



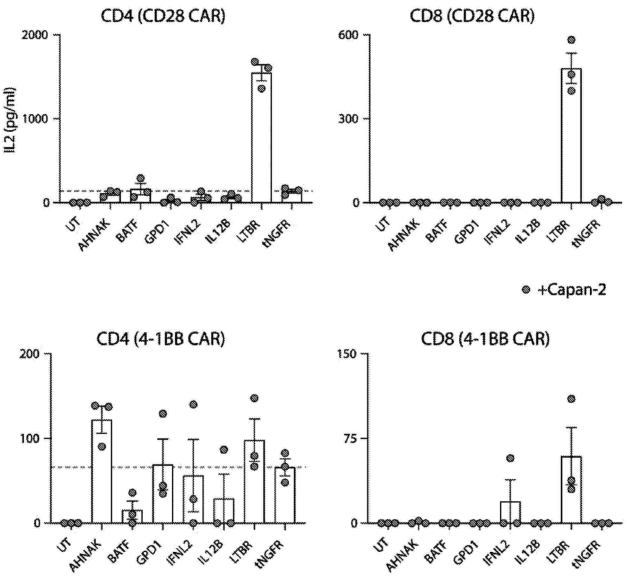
【図１６Ａ】



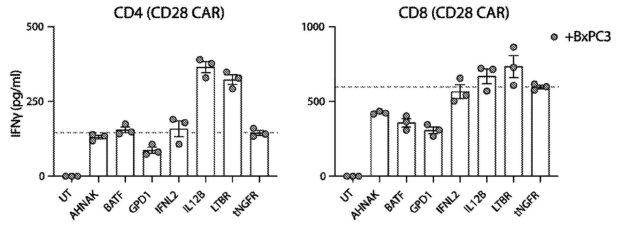
【図１６Ｂ】



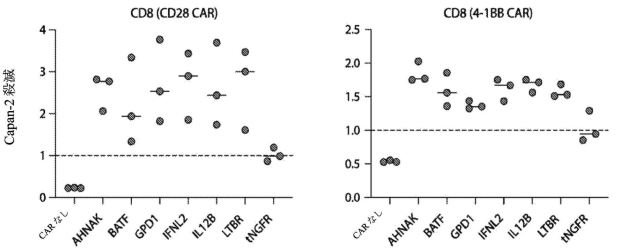
【図１６Ｃ】



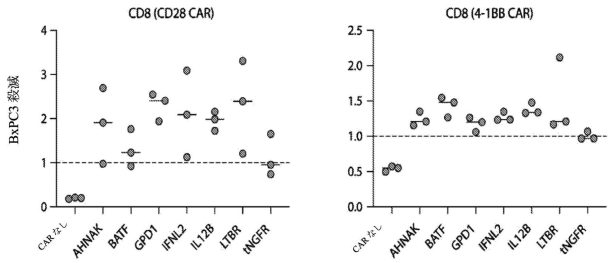
【図１６Ｄ】



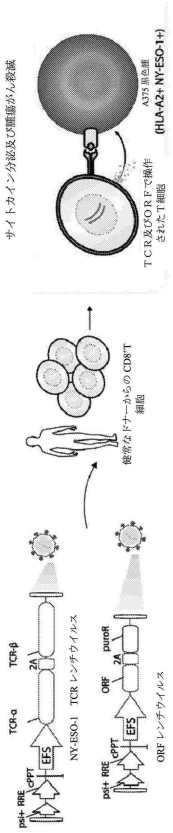
【図１６Ｅ】



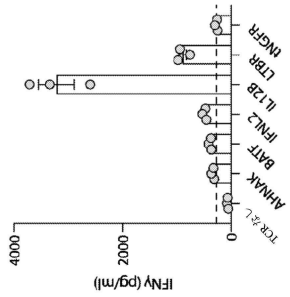
【図１６Ｆ】



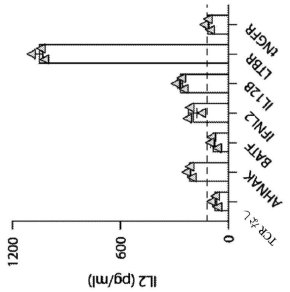
【図１７Ａ】



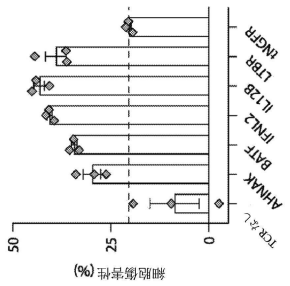
【図１７Ｂ】



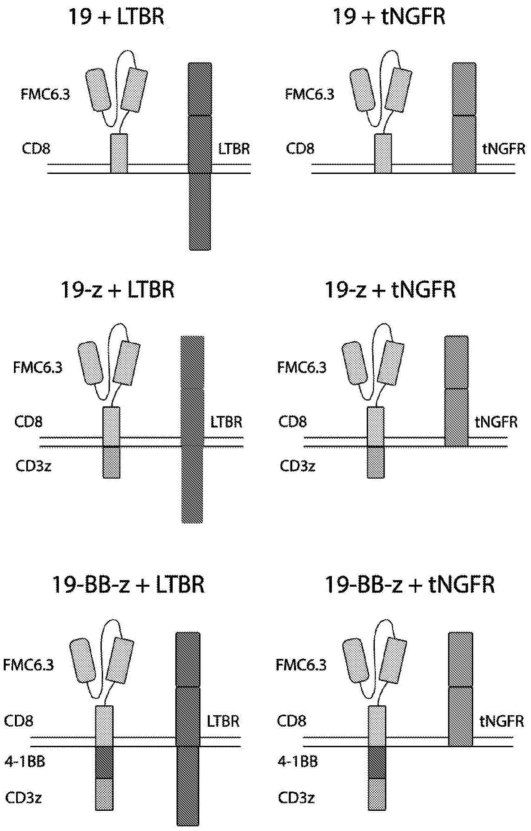
【図１７Ｃ】



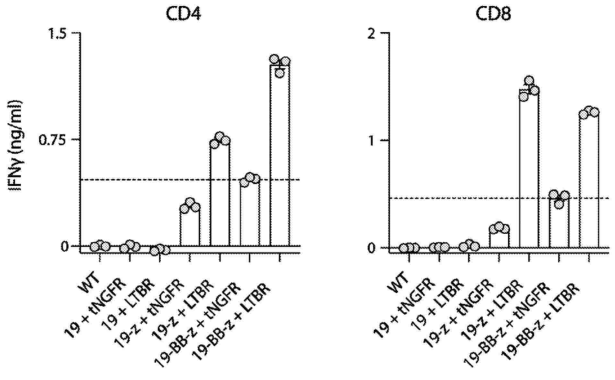
【図１７Ｄ】



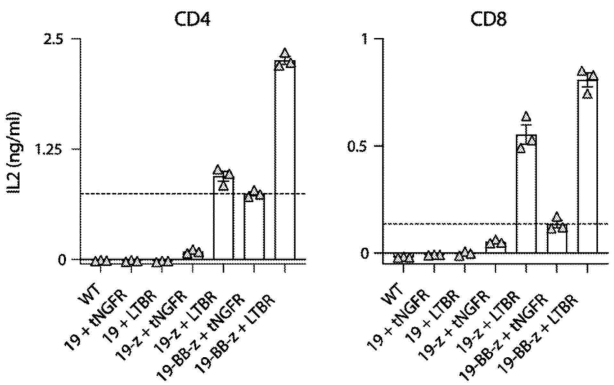
【図１８Ａ】



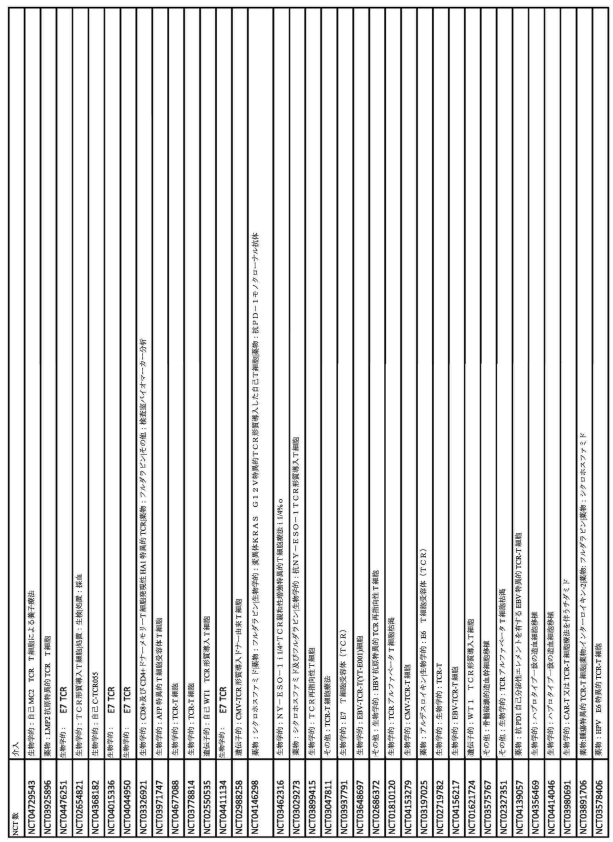
【図１８Ｂ】



【図１８Ｃ】



【図１９Ａ】



NCT番号	介入
NCT00509288	生物学的：自己EMA ART－１ ＦＳ Ｔ細胞受容体療法：シクロホスファミド投薬：フルダラビン投与療法：アルデスロイキン生物学的：自己EMA ART－１ ＦＳ Ｔ細胞受容体療法で遺伝的修飾細胞のリンパ球
NCT03354390	生物学的：細胞注入
NCT02030847	生物学的：　CART-19
NCT00691224	生物学的：ＷＴ－ａｋａ－ＴＣＲ改変Ｔ細胞注射学的：16-mg-TCR改変Ｔ細胞とその他：ＳＴＩ入力抗体注
NCT03647746	デバイス：ChimAAC
NCT03819699	生物学的：HSCT前のコンディショニングのためのGCSF：注射学的：HSCT前のコンディショニングのためのGCSF注射のガンリキサフォル
NCT02380911	薬物：フルダラビン投薬：シクロホスファミド注射学的：Ｅ６　ＴＣＲ投薬：アデスロイキン
NCT04194190	薬物：第４の患者でＣＲＥＳＰＲ導入ＰＢＬ
NCT02153905	薬物：アルデスロイキン投薬：フルダラビン投薬：シクロホスファミド注射学的：ＨＬＡ－Ａ Ａ患者標的（ＨＬＡ－Ａ*０２）内の抗 ＭＡＧＥＡ３ｐ１９ｈｌａ抗原提示複合体を標的とする細胞受容体（ＴＣＲ）
NCT02057159	生物学的：Ｎｅｔｅｖａｓｉｍ投与療法：静脈内ｅｆ
NCT00610311	薬物：シクロホスファミド投薬：フルダラビン投与療法：アルデスロイキン注射学的：ALVAC(gp100リクナラン注射学的：抗gp100：154－162Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）末梢血リンパ球（ＰＢＬ）
NCT02070406	薬物：シクロホスファミド投薬：フルダラビン投与療法：ＮＹ－ＥＳＯ－１抗原的ＴＣＲ：トロウイルスベクター－形質導入Ｔ自己ＰＢＬ注射学的：修正細胞ワクチン－膜結合型顆粒：アルデスロイキン投与療：アルデスロイキン投与療：フルダラビン投与療法：シクロホスファミド（ＴＣＲ）
NCT02149706	生物学的：Ｎｅｔｅｖａｓｉｍ投与：静脈内注射ｅｆ
NCT04618462	行動：デジタル情報表現表現情報（ＤＩＲ）プログラム
NCT00612222	生物学的：自己ＭＡＧＥ－Ａ３ＴＣＲ改変細胞注射末梢血Ｔリンパ球注射学的：ALVAC　MAGE-Aワクチン注射学的：アルデスロイキン投与：シクロホスファミド投与：リンパ球アブレーション
NCT02111850	生物学的：抗ＭＡＧＥ－Ａ３ＨＬＡ－Ａ＊０２：ＤＰＢ１ＴＣＲ改変Ｔ細胞：シクロホスファミド投薬：フルダラビン投与：アルデスロイキン
NCT00923390	遺伝子的：ＤＣ－ＴＣＲ－トロウイルスベクター－形質導入Ｔｙｐｅ投与：フルダラビン投与：シクロホスファミド投薬：フルダラビン投与：（ＰＧ１３－ＡＤＰＲ－Ｅ４５８Ｃ７ａ－Ｈｅｌｐ２Ｄ－ＴＣＸ）－トロウイルスベクター－形質導入リンパ球
NCT01273181	生物学的：ＰＧ１３－ＭＡＧＥ－Ａ３１２　ＴＣＲ：形質導入自己末梢血リンパ球投与：アルデスロイキン投与：シクロホスファミド投与：フルダラビン
NCT02633592	生物学的：自己抗ＣＤ１２３　ＣＡＲ：ＴＣＲ＆ＨＩＶ感染Ｔリンパ球投与：シクロホスファミド
NCT04379466	生物学的：自己ＴＢＩＭ－３投与：シクロホスファミド投与：フルダラビン
NCT02366546	薬物：ＴＢＩＭ－３投与：シクロホスファミド投与：フルダラビン
NCT04665388	
NCT02096614	薬物：ＴＢＩＭ－３投与：シクロホスファミド投与：フルダラビン
NCT00670748	生物学的：ＮＹＥＳＯ－１　Ｔ細胞受容体ＰＢＬ投与：アルデスロイキン投与：シクロホスファミド投与：リンパ球アブレーション投与：ＡＬＶＡＣ　ＮＹ　ＥＳＯ－１ワクチン
NCT01697527	生物学的：アルデスロイキン投与：リンパ球アブレーション投与：シクロホスファミド：ＰＤ－１阻害：ＭＡＧＥ－Ａ３ＴＣＲ改変Ｔ細胞：リンパ球アブレーション投与：シクロホスファミド投与：フルダラビン投与：ＭＡＧＥ－Ａ３ＴＣＲ改変Ｔ細胞：ＰＤ－１阻害

【図１９Ｅ】

NCT番号	介入
NCT00091104	生物学的：MART-1 27–35ペプチドリポソーム注射剤中の；アルデスロイキン注射剤中の；ポリICLC注射剤中の；不完全フロイントアジュバント注射剤中の；自己由来リンパ球注射剤中の；シクロホスファミド投薬中；リン酸フルダラビン投薬：自己造血幹細胞移植処置（イントロ処置した末梢血幹細胞移植処置：全身照射
NCT00082462	生物学的：アルデスロイキン注射剤中の；ワイルダラスタム注射剤中の；gp100-腫瘍ワクチン注射剤中の；治療用自己リンパ球注射剤中の；治療用組換型黒色腫リンパ球投薬中；シクロホス
NCT01284504	薬物：セレコキシブ注射剤中の；ゾラドロン酸
NCT02408016	生物学的：アルデスロイキン注射剤中の；自己 WT1-TCRc4 遺伝子導入 CD8 陽性 TumTh リンパ球投与中；シクロホスファミド投薬中；フルダラビン投薬：アルデスロイキン投薬：腫瘍内注入手術
NCT01370213	薬物：組換えインターロイキン-2注射剤中の；NK 細胞増殖：インターロイキン-2注射剤中の；CD34 グラフト抗胸腺細胞グロブリン　　注射剤中の：ドナー-TCR　　Tg/Fr-転移したグラフト vs ATO
NCT03453801	生物学的：FluoroA（低線量照）注射中；FluMaA（低線量照）
NCT03156101	生物学的：BinD19
NCT03265106	生物学的：BinD19
NCT04222595	その他：Fluxx Totra 鼻スプレー薬剤
NCT02571166	生物学的：HSV2Gn薬物：パタリクロビル
NCT01640301	生物学的：アルデスロイキン薬物：シクロホスファミド投薬：リン酸フルダラビン代の他：被査査パイオマーカー分析生物学：WT1感作同種異系Tリンパ球
NCT01240045	生物学的：プロメライン及びエポザイン
NCT02942173	生物学的：CD40A-抗胸腺細胞
NCT04534322	薬物：メルファランフルオロエトキシ薬物：メチルプタン
NCT03738228	薬物：アテゾリズマブ投与中；造血幹細胞移植治療中；シスプラチン投与中；放射線治療
NCT04877613	薬物：組換型ヒトCAR-CPAA細胞薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド
NCT03366661	生物学的：ALT-803
NCT04646837	薬物：チオホスピロデ薬物：アルデスロイキン注射剤中；カルボプラチン
NCT02617108	デバイス：フォーリーバルーン
NCT02809560	処置：高張性血液を使用した静脈投与方法
NCT03391778	遺伝子　GSK3377794 (NY-ESO-1[PolA][pal3 T)
NCT02133196	薬物：アルデスロイキン薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド注射剤中；Young TIL
NCT03397186	処置：生物学的療法：臨床査パイオマーカー分析検査品：トラベクテジン
NCT03849651	薬物：シクロホスファミド注射剤中；フルダラビン薬物：チオホスピロデ薬物：メスプラタン注射剤中；Gas薬物：メスプラビデバイス；ClinMACS生物学的；ATO（ひ素剤）薬物：プリテクセリン 注射剤中；TCREx/Fn注射剤中；CD19+注射剤中；CD45RA-抗体CU
NCT03953599	生物学的：CD19-STAR-T 細胞
NCT00924326	薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド注射剤中；抗分泌抗体 19（CD19）-CAR　PBL薬物：アルデスロイキン
NCT02719405	栄養補助食品：Lactobacillus　GG(栄養補助食品：活菌菌に加水の発されたカゼイン配合物(栄養補助食品：アミノ酸配合物
NCT01454596	その他：血液検体及びネーベイ収集
NCT01209676	薬物：IMCgp100注射

【図１９Ｆ】

NCT番号	介入
NCT02624258	生物学的：CD19　RNA再指向性自己T細胞（RNA　CART19細胞）
NCT04640987	生物学的：末梢血単核細胞移植デバイス：ClinMACS　Prodigy　System投薬品：T-allo10細胞アドバンス
NCT03017131	生物学的：アルデスロイキン薬物：シクロホスファミド投薬：デクタビン注射剤中；遺伝子操作した NY-ESO-1 特異的Tリンパ球その他：検査査パイオマーカー分析
NCT01154387	薬物：活細胞細胞プログラム療法：TOLIO薬物：スティバ薬物：タキソル入り薬物：エコフェノール療マテクル（MMF）
NCT01551043	生物学的：CART-19
NCT03336567	その他：電荷イノクビュー
NCT04558736	薬物：抗腫瘍細胞グロブリン（ひそ剤）薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド薬物：メスナ薬物：GCS溶液静脈　静リン静脈）TLD デバイス：ClinMACS生物学的；HPC，BX査査学的； CD45RA 抗体 PBL
NCT03587376	薬物：アクベセタント
NCT02586612	薬剤：シクトホスファクトルーセルGSK3377794薬物：シクトホスファミド注射剤：フルダラビン
NCT03634683	生物学的：14aCps
NCT01700192	生物学的：MK-8237 経口生物学的；シクセ経口薬物：レスキュー治療：自己造血幹細胞など4ラリン薬物：レスキュー治療：オロパタジン点眼薬物：レスキュー治療：ケトチフェン点眼薬物：レスキュー治療：ケトチフェン点眼薬
NCT03912831	薬物：KITE-439薬物：シクトホスファミド注射剤：フルダラビン
NCT04345124	その他：輸血投与療法患者様トレーニング その他：採血時の値取り ヒドリテーション
NCT04402892	その他：血液 35ml、骨髄ベベリ-骨り チタムスチューブ（入院患者）その他：血液 35ml、骨髄ベベリ-骨り チタムスチューブ（自宅 L.（血液）
NCT02055521	処置：血液採取、血検
NCT04650724	薬物：IACAA キメラ抗原受容体を標的とする T 細胞注入剤
NCT01982890	その他：対照
NCT04858828	
NCT04447053	薬物：ペムペマブ静脈投与[Humyou]
NCT03649529	生物学的：GPA-TriMAR-T
NCT02770820	生物学的：アルデスロイキン注射剤中；自己 WT1-TCRc4 遺伝子導入 CD8 陽性 TumTh リンパ球それの他：検査査パイオマーカー分析
NCT03132792	遺伝子的：自己遺伝子改変　AFP特異的TCR T 細胞
NCT03392545	併用製品：免疫アジュバントと放射線の組み合わせ
NCT04639047	その他：遺伝子変異検出の方法
NCT04494893	
NCT04900382	処置：生検薬物：ガルボプラテン薬物：パクリタキセル注射中；ゲムシタビン
NCT00706992	生物学的：ALVAC-MART-1 ワクチン注射中；MART-1:26-35(27L)ペプチドワクチン注射中；アルデスロイキン注射中；自己抗 MART-1　F5　T 細胞受容体遺伝子操作した末梢血リンパ球
NCT04201873	生物学的：再投与フロインアジュバント
NCT04692948	その他：ネイラ抗原受容体 T 細胞（ｎａｒｅ－１）
NCT02636855	
NCT03409796	投薬補助食品：グルタン
NCT04518864	生物学的：TASSTI 6001 細胞

【図１９Ｇ】

NCT番号	介入
NCT03560258	医薬品：パーソナライズドネオアンチゲン薬物：ペンブロリズマブ
NCT03517956	生物学的：LNKT 細胞の注入
NCT01723306	遺伝子的：遺伝子改変 T 細胞
NCT02707808	薬物：IMCgp100
NCT02776813	生物学的：ACTR001注射中的；リプキシング
NCT04713163	薬物：sovelig ラクチン
NCT03267641	
NCT02154646	生物学的：CART-19　T 細胞
NCT02546167	生物学的：CART-BCMA
NCT02030834	生物学的：CART-19
NCT02711696	行動：OCED、グルデン摂入指定ダイエット
NCT03093688	生物学的：INKT 細胞及び CD3+T 細胞の注入
NCT02681302	薬物：イピリムマブ薬物：ニボルマブ
NCT02460110	その他：ACTR　T 細胞生成物
NCT04782338	その他：VRS06 被験薬入生存注 CD4　T 細胞
NCT03921047	処置：生物学的試験：その他：検査査パイオマーカー分析
NCT02333760	遺伝子的：WASP レンチウイルスベクターで修復導入した自己 CD34+細胞
NCT03515551	薬物：DiOpoo
NCT01921036	処置：栄養のご摂りハビリテーション処置：複合運動
NCT04556474	
NCT00004178	生物学的：治療用自己リンパ球
NCT04782338	その他：選択レイキ中その他：偽装様レイキ
NCT02661659	生物学的：マルチペプチドワクチン S-588210
NCT01211262	薬物：IMCgp100
NCT01036399	薬物：レナリドマイド
NCT04790409	薬物：PD－1 阻害免疫ガンマグロブリン
NCT02244450	生物学的：SCID スタリーニング
NCT02702427	生物学的：ウイルス特異的 T 細胞
NCT03559803	薬物：シスプラチン
NCT04884168	生物学的：Dc-CIK 免疫療法
NCT02941744	薬物：ニボルマブ薬物：イピリムマブ
NCT00019136	生物学的：MOv ガンネオスタ安全性査品生物学的；アルデスロイキン生物学的；治療用自己由来リンパ球
NCT02472704	栄養補助食品：グルデン食品添加物食品：プラセボ食料
NCT03541083	薬物：プリテキサン
NCT01050296	
NCT04411043	行動：ホテネラクタクタイオーション（Molecular nanoclonation）

【図１９Ｉ】

NCT番号	介入
NCT00341146	
NCT03709719	薬物：ブリナツモマブ注射
NCT04729452	その他：血液検査
NCT02980146	その他：非介入試験
NCT03166878	生物学的：UCART019
NCT03038334	栄養補助食品：硫酸マグネシウム
NCT03644043	デバイス：EEGスキャン
NCT03038282	栄養補助食品：塩化クロム|その他：個々の運動
NCT00172666	
NCT02889861	薬物：｜MCgp100
NCT02102893	
NCT03209245	生物学的：Purethal Mites|その他：プラセボ注射|診断検査：アレルゲン特異的 IgE のモニタリング|診断検査：アレルゲン特異的 IgG4 のモニタリング
NCT01384201	
NCT03523429	薬物：ブリナツモマブ
NCT00396695	処置：血液検査
NCT04908514	薬物：ADX-629
NCT02590328	
NCT00924287	薬物：インビトロ腫瘍反応性、キメラT細胞受容体（ＣＡＲ）遺伝子導入ＰＢＬ＋ＩＶアルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：メスナ
NCT03088904	生物学的：FluvistÂ（登録商標）四価|生物学的：FluzoneÂ（登録商標）四価ワクチン
NCT04262466	薬物：｜MC-F106C｜薬物：抗 PD(L)1
NCT01231841	薬物：シクロスポリン|生物学的：抗胸腺細胞グロブリン
NCT01207388	薬物：ブリナツモマブ
NCT04622423	その他：観察研究
NCT04034225	薬物：｜SNS-301｜薬物：ペンブロリズマブ
NCT01020396	薬物：メトロニダゾール
NCT01906632	生物学的：DC-CIK 免疫療法
NCT03325465	薬物：ペンブロリズマブ|薬物：エパカドスタット
NCT00894842	薬物：プレグネノロン|薬物：プラセボ
NCT04337515	デバイス：CliniMacsÂ（登録商標）
NCT03397355	
NCT03070392	生物学的：IMCgp100|薬物：ダカルバジン|生物学的：イピリムマブ|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04206943	生物学的：Car-T 細胞療法
NCT04406272	薬物：BV11|処置：手術|その他：プラセボ|薬物：ペバシズマブ
NCT04691713	薬物：ＣＤ２７６自己キメラ抗原受容体Ｔ細胞を標的とする
NCT04691349	薬物：｜CAR-T

【図１９Ｊ】

NCT番号	介入
NCT03132922	遺伝子的：自己遺伝子改変 MAGE-　　-A4á¶œÃ¯ÃoÃ³Ã²T 細胞|放射線: 低線量放射線と組み合わせた自己遺伝子改変 MAGE-A4c1032T 細胞
NCT02370212	栄養補助食品：クレアチン|栄養補助食品：プラセボ|その他：高強度インターバルトレーニング
NCT04405154	生物学的：カムレリズマブ|薬物：シスプラチン|放射線：IMRT 又は VMAT
NCT00871481	生物学的:イピリムマブ|薬物:シクロホスファミド|処置:生検|生物学的:アルデスロイキン|その他:免疫組織化学染色方法|遺伝子的:ポリメラーゼ連鎖反応|その他:免疫酵素技法|生物学的:治療用細胞傷害性Ｔリンパ球
NCT01077531	薬物：オテリキシズマブ|薬物：銀含有クラセボ
NCT03619551	薬物：プスルファン|デバイス：ＴＣＲＩ±Ｐ∈ＣＤ１９+枯渇のための細胞処理
NCT04844489	その他：SARS-CoV-2 バリアントに対する体液性応答及び COVID-19 に対するワクチン接種後の細胞応答の試験のための血液試料
NCT01863888	薬物：テリフルノミドHMDR1726|薬物：コレステラミン|薬物：チャコール
NCT01430390	生物学的：生物学的|遺伝子改変Ｔ細胞|薬物：シクロホスファミドベースの化学療法
NCT03335605	
NCT03340155	その他：光（化学）療法
NCT04523376	デバイス：CliniMACS
NCT00113464	
NCT04913519	薬物：｜TDM-105795｜薬物：プラセボ
NCT01355965	生物学的：自己Ｔ細胞
NCT02319226	その他：HLA 同一同胞ドナーからの移植
NCT01440413	生物学的：血液及び腫瘍試料
NCT01175239	遺伝子的：自己不活性化（ＳＩＮ）ガンマレトロウイルスベクターｐＳＲＳ１１．ＥＦＳ．ＩＬ２ＲＧ．ｐｒｅで形質導入した自己ＣＤ３４＋細胞の単回注入
NCT03973333	薬物：｜MC-C103C｜薬物：テアゾリズマブ
NCT02028819	薬物：ドルテグラビルナトリウム一水和物|薬物：イバリズマブ
NCT04195932	その他：エクササイズトレーニング
NCT00560794	生物学的：ブリナツモマブ(MT103)
NCT04326751	
NCT00845416	
NCT03587285	生物学的：Ｔｃｍ+酢酸ゴセレリン+ピカルタミ|生物学的：Ｔｃｍ+酢酸ゴセレリン+酢酸アビラテロン
NCT01174875	
NCT04727151	生物学的：TAC01-HER2
NCT03407170	生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04864379	生物学的：iNeo-Vac-P01|その他：GM-CSF|薬物：PD-1|処置：RFA
NCT03880279	生物学的：TAC01-CD19
NCT04134325	生物学的：ニボルマブ|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04354038	
NCT03697824	薬物：｜GSK3377794｜薬物：ペンブロリズマブ|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT02799901	生物学的：ニボルマブ|放射線：低分割放射線療法
NCT00545493	薬物：タクロリムス|薬物：ｉ．ｖ．免疫グロブリン

【図１９Ｋ】

NCT番号	介入
NCT03802955	薬物：｜ADG106
NCT00694551	生物学的：ペプチドワクチン|医薬品：ポリ ICLC
NCT03707093	薬物：｜ADG106
NCT04145232	生物学的：生検（FFPE）、血液（PBMC）、及び便の収集
NCT03878589	薬物：オキシトシン（OT）|薬物：プラセボ(P)
NCT00785967	生物学的：各種ワクチン
NCT04397900	
NCT02706392	その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：RORｌ　CAR 特異的自己Ｔリンパ球
NCT03904069	薬物：｜AMG 553
NCT02210741	
NCT04362293	薬物：ヒドロキシ尿素、アザチオプリン、アレムツズマブ、チオプラパ（thiotepa）、低用量全身照射、及びシクロリムス|薬物：ヒドロキシ尿素、アザチオプリン、アレムツズマブ、ザプテパ（thiotepa）、プレリキサフォル、低用量全身照射、シクロホスファミド、及びシクロリムス
NCT01260532	
NCT00001688	薬物：リトナビル|薬物：ネビラピン|薬物：スタブジン
NCT04340401	薬物：｜SHR-1210｜薬物：オキサリプラチン|薬物：カペシタビン|放射線：強度変調放射線療法|処置：全直腸間膜切除術
NCT00081783	薬物：Xcellerated　Ｔ細胞
NCT00327496	生物学的：DC ワクチン
NCT01410019	その他：遺伝子移入
NCT04065776	放射線：陽子回避プロトン療法
NCT00678886	生物学的：オテリキシズマブ注入＋医師決定した標準ケア|生物学的：プラセボ注入＋医師決定した標準ケア
NCT04422314	診断検査：T-Detect　Lyme
NCT04482699	生物学的：COVID-19 の RAPA-501-Allo 既製療法|その他：プラセボ
NCT04207320	デバイス：Miteny　CliniMACS システムによる『±Ｐ∈T 細胞枯渇
NCT02219165	薬物：静脈内ヒト免疫グロブリン|薬物：アルブミン
NCT02466217	その他：1: AID 群|その他：2: 対照群
NCT02889016	
NCT00342134	処置：幹細胞移植
NCT01982487	生物学的：ALVAC（2）-NY-ESO-1（M）/TRICOM ワクチン|薬物：IDO1 阻害剤 INCB024360|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：薬理学的試験
NCT02166905	生物学的：DEC-205/NY-ESO-1 融合タンパク質 CDX-1401|薬物：エパカドスタット|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：薬理学的試験|薬物：ポリＩＣＬＣ
NCT02535078	薬物：｜MCgp100｜薬物：デュルバルマブ|薬物：トレメリムマブ
NCT04658303	その他：ピモニダゾール
NCT00001941	生物学的：ダクリズマブ
NCT02618109	生物学的：血液試料の収集
NCT03948763	|生物学的：V941|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT02761122	処置：ヒト生体試料

【図１９Ｌ】

NCT番号	介入
NCT01744223	|生物学的：BPX-501 用量 1|薬物：リミデュシド|生物学的：BpX-501 用量 2|生物学的：ＢＰＸ－５０１用量３|生物学的：BPX-501 用量 4|処置：SCT
NCT00839436	薬物：｜CVT107
NCT04451980	処置：皮下脂肪組織生検|放射線：CT スキャン|診断検査：経口グルコース耐性試験|診断検査：血液収集
NCT04369963	処置：生検を伴う食道胃十二指腸内視鏡検査及び粘膜内視鏡検査
NCT00924001	薬物：DMF5 メラノーマ反応性 TIL|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン
NCT03578185	
NCT01883804	薬物：メチルドパ
NCT04697940	生物学的：デシタビン-プライム化タンデム CAR19/20 操作した T 細胞
NCT00213629	その他：トランスクリプトーム分析|その他：T 細胞レパートリー分析
NCT01192464	薬物：自己 CARCD30　EB 特異的 CTL
NCT00597441	生物学的：ＵＣＢ移植のレシピエントのための臍帯移植
NCT01413022	薬物：オキサリプラチン|薬物：イリノテカン|薬物：ロイコボリン|薬物：フルオロウラシル|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：フローサイトメトリー|その他：免疫組織化学染色法|その他：薬理学的試験|薬物：PF-04136309
NCT03680560	生物学的：ACATR　T 細胞生成物|薬物：トラスツズマブ
NCT01114503	薬物：オテリキシズマブ-低用量|薬物：オテリキシズマブ-中低用量|薬物：オテリキシズマブ-中高用量|薬物：オテリキシズマブ-高用量|薬物：オテリキシズマブ|薬物：メチルプレドニゾロン
NCT04549142	その他：介入なし
NCT00324623	|生物学的：Melan-A　VLP ワクチン、IMP321 アジュバント|生物学的：養子免疫療法|生物学的：治療用自己リンパ球|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT04354584	
NCT00379119	|その他：診断検査室バイオマーカー分析|その他：フローサイトメトリー|その他：生理学的検査|処置：コンピュータ断層撮影
NCT00471887	生物学　　CP-675,206
NCT03795610	薬物：｜IPI-549
NCT04903795	薬物：hEGFRvIII-CD3（BiRTE）|生物学的：活性化細胞療法
NCT03396575	生物学的：GM-CSF を有する TTRNA-DC ワクチン|生物学的：TTRNA-xALT|薬物：シクロホスファミド+フルダラビンリンパ枯渇コンディショニング|薬物：用量増強 TMZ|薬物：Td ワクチン|生物学的：自己造血幹細胞（HSC）
NCT03129061	薬物：[18F]Ｆ－Ａｒａ Ｇ　ＰＥＴスキャン、ベースライン+抗ＰＤ－１療法後。
NCT00520130	生物学的：リツキシマブ|薬物：シクロスポリン|薬物：同種異系幹細胞移植（ASCT）|薬物：コンディショニング化学療法|薬物：TMS|薬物：FLAG|薬物：EPOCH-R|生物学的：アレムツズマブ
NCT04445844	生物学的：Pelareorep|その他：生活の質の評価|その他：アンケート管理|生物学的：レチファンリマブ
NCT02846376	薬物：ニボルマブ|薬物：イピリムマブ
NCT03159845	薬物：経腸栄養経口製品|薬物：レボフロキサシン 500Mg 経口錠剤|薬物：フルコナゾール 200mg タブ|薬物：デシクロビル 400MG
NCT04792437	処置：手術
NCT01911065	生物学的：ブスタバックス　　κâ„¢C
NCT01583972	栄養補助食品：パルミチン酸レチニル|栄養補助食品：プラセボ
NCT04224558	薬物：メスナ|薬物：シクロホスファミド|薬物：フィルグラスチム|処置：アフェレーシスカテーテル留置|処置：白血球アフェレーシス|薬物：フルダラビン|薬物：メチルプレドニゾロン|薬物：ジフェンヒドラミン|薬物：アセトアミノフェン|薬剤：抗胸腺細胞グロブリン（ウサギ）|薬剤：リンパ球免疫グロブリン|生物学的：末梢血幹細胞注入|薬物：シトキサン
NCT00439465	|生物学的：エクスビボ拡張したエフェクター細胞

【図１９Ｍ】

NCT番号	介入
NCT04626440	処置：診断放射又は臨床転帰
NCT03877250	診断検査：治療前生検|診断検査；治療中生検|診断検査；疾患進行時の生検|診断検査；末梢血液ベースの試験
NCT03601286	薬物：レンチウイルスベクター形質導入ＣＤ３４＋細胞
NCT00621452	生物学的：治療用自己リンパ球|薬物：シクロホスファミド|生物学的；アルデスロイキン|遺伝子的：ポリメラーゼ連鎖反応|遺伝子的：遺伝子再配列分析|処置：リンパ節生検|生物学的：遺伝子操作したリンパ球療法|処置：骨髄吸引|その他：フローサイトメトリー|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：酵素結合免疫吸着アッセイ
NCT04708535	
NCT01670994	生物学　ALT-801
NCT01625260	生物学的：ALT-801|薬物：ゲムシタビン
NCT02055196	生物学的：カルボキシルエステラーゼ発現性頭頸部系神経幹細胞|薬物：イリノテカン塩酸塩|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT01326871	薬物：シスプラチン|薬物：ゲムシタビン|生物学的：ALT-801
NCT01029873	薬物：シスプラチン|生物学的：ALT-801
NCT00496860	生物学　ALT-801
NCT02737046	薬物：ペリノスタット|薬物：ジドブジン|薬物：インターフェロンベルファ-2b|薬物：ペグ化インターフェロンベルファ-
NCT04562623	
NCT02923180	薬物：エノブリツズマブ
NCT03168464	薬物：イピリムマブ|薬物：ニボルマブ|放射線：放射線療法
NCT04215471	薬物：PD-L1 抗体 SHR-1316
NCT01750879	薬物：ピーナッツ粉|薬物：オート麦粉
NCT04052334	薬物：　TIL|薬物：インターロイキン－2|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT01215682	栄養補助食品：ビタミン D|栄養補助食品：プラセボ
NCT04042415	その他：カロリー制限|その他：牛乳及びグルテンを有しないカロリー制限
NCT03491683	生物学的：INO_5401|生物学的：INO-9012|生物学的：セミプリマブ|放射線：放射線療法|薬物：テモゾロミド
NCT04355780	
NCT03168438	薬物：レトレスゲンアクトルーセル|薬物：ペンブロリズマブを伴うレトレスゲンアクトルーセル|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|薬物：ペムブロリズマブ
NCT02992743	薬剤：レトレスゲンアクトルーセル(GSK3377794)|薬剤：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT01827579	生物学的：ＣＤ２５／７１アロ拡張したドナーＴ細胞
NCT02921269	薬物：アテゾリズマブ|生物学的：ベバシズマブ|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT01339000	薬物：グリコシル化組換えヒトインターロイキン-7|生物学的：ジフテリア／破傷風ワクチン|生物学的：ポリオワクチン|生物学的：肺炎球菌ワクチン|生物学的：A 型肝炎ワクチン|生物学的：B 型肝炎ワクチン
NCT03318900	生物学的：アルデスロイキン|薬物：CD8 陽性ＴリンパＳ幼|薬物：シクロホスファミド|処置：白血球アフェレーシス|生物学的：クトミルマブ
NCT02015819	生物学的：E.coli　CD 発現遺伝子改変幹細胞抽|薬物：フルシトシン|薬物：ロイコボリンカルシウム|その他：薬理学的試験|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT01446016	薬物：タキサン|薬物：ドセタキセル|薬物：アプラキサン|薬物：イキサベロン
NCT03628859	生物学的：免疫学的及び臓器の特性評価
NCT03425461	生物学的：抗ＳＥＭＡ４Ｄモノクローナル抗体ＶＸ１５／２５０３／生物学的：イピリムマブ|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：ニボルマブ|その他：薬理学的試験

【図１９Ｎ】

NCT番号	介入
NCT04588038	生物学的：エフィネプタキンアルファ
NCT03584828	行動：遠隔心臓リハビリテーション
NCT04086290	処置：RARP|放射線：SBRT|薬物：ADT
NCT00004918	生物学的：PR1 自由病ペプチドワクチン|薬物：モンタニドISA 51 VG|生物学的：サルグラモスチム|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT03030352	行動：ハウワー子育てプログラム
NCT03714490	放射線：SCPRT＋ネオアジュバント化学療法|放射線：長期経過化学放射線
NCT04532944	診断検査：エネルギー機能不全のイメージング
NCT03879876	薬物：ヒトＴリンパ様前駆体（ＨＴＬＰ）注射
NCT02375711	生物学的：血液試料
NCT02864082	薬物：　PAT-001, 0.1%|薬物：　PAT-001, 0.2%|薬物：ビヒクル
NCT02682238	薬物：　BBI-4000, 15%|その他：ビヒクルジェル
NCT01368107	薬物：プラセボ|薬物：インターロイキン７
NCT03978624	薬物：ペンブロリズマブ|薬物：エンチノスタット
NCT03223155	薬物：ニボルマブ|薬物：イピリムマブ|放射線：定位放射線療法
NCT00451321	薬物：オテリキシズマブ
NCT02010203	生物学的：HS-410|生物学的：プラセボ|生物学的：BCG
NCT01460160	薬物：ダサチニブ
NCT03953794	デバイス：Fitbit　Charge　3
NCT01280955	薬物：アレリキサフォル
NCT03341143	薬物：ペムブロリズマブを伴う異種微生物叢移植
NCT04373200	生物学的：血液試料収集|その他：唾液収集
NCT01536054	生物学的：ALVAC（2）-NY-ESO-1（M）/TRICOM ワクチン|薬物：シロリムス|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学的：サルグラモスチム
NCT03618641	薬物：CMP-001|生物学的：ニボルマブ
NCT00301990	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：ベバシズマブ
NCT03249870	薬物：イノツズマブオゾガマイシン（INO）
NCT04714983	生物学　DNX-2440
NCT04495894	薬物：術前ケトロプラック
NCT03167151	薬物：ペンブロリズマブ
NCT04102150	薬物：パレキスタットトシル酸塩
NCT04196491	生物学的：bb2121 カルフィルゾミブ|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|薬物：レナリドマイド
NCT03927898	薬物：トリメリマブ|放射線：定位放射線療法
NCT04765462	生物学的：同種異系　　ＴＩＬＴ細胞
NCT04553393	薬物：チダミドン|薬物：デシタビン|薬物：チダミド及びデシタビン|生物学的：デシタビン-プライム化ケンダムCAR19/20 操作した T 細胞
NCT03971214	薬物：PD-1 阻害剤 JS-001
NCT02116270	生物学的：血液試料
NCT04286815	デバイス：レンチウイルスベクター遺伝子療法

【図１９Ｏ】

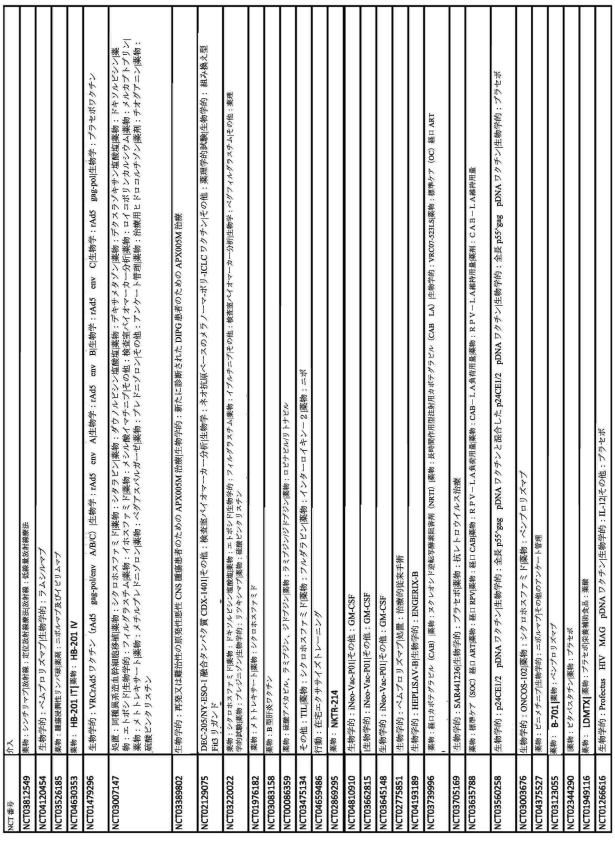
NCT番号	介入
NCT04330118	
NCT04394884	
NCT04888611	生物学的：カムレリズマブ+GSC-DCV|生物学的：カムレリズマブ+プラセボ
NCT01488552	薬物：ゲムシタビン|薬物：nab-パクリタキセル|薬物：FOLFIRINOX|遺伝子的：免疫組織化学（IHC）分析|薬物：メトホルミン|薬物：mFOLFIRI
NCT02741323	薬物：マラピロク|薬物：プラセボ
NCT02014506	薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：抗胸腺細胞グロブリン|生物学的：フィルグラスチム|放射線：全身照射|処置：TCRα/β-枯渇造血細胞移植|デバイス：CliniMACS
NCT04133948	[薬物：ドマチノスタット|薬物：ニボルマブ|薬物：イピリムマブ
NCT03312244	薬物：臭化ピリドスチグミン|薬物：プラセボ
NCT00361101	薬物：　AMD11070
NCT03827967	生物学的：PalloV-CC
NCT03784014	薬物：ニロチニブ|セリチニブ|薬物：カブマチニブ|薬物：テパチニブ|薬物：トラメチニブ|併用製品：トラメチニブ及びダブラフェニブ|併用製品：オラパリブ及びデュルバルマブ|薬物：パルボシクリブ|薬物：グラスゼタブ|薬物：TAS-120|その他：次世代配列決定|エクソーム
NCT01607216	
NCT01343043	生物学的：NY-ESO-1(c259)T 細胞
NCT01066377	栄養補助食品：プレバイオティクス及びプロバイオティクスの混
NCT03967223	薬剤：レテトレスゲンアクトルーセル(lete-cel,GSK3377794)|薬剤：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT02989064	遺伝子的：自己遺伝子改変 MAGE　　A10ä¶œä-ä¹ä¹Ｔ細胞
NCT02592577	生物学的：自己遺伝子改変Ｔ細胞、　　，MAGEA10ä¶œä-ä¹ä¶¶Ｔ
NCT02876510	[薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：IMA101 生成物|生物学的：組換えヒトインターロイキン-2|診断検査：IMADetect|薬物:アテゾリズマブ
NCT03260712	[薬物：ペンブロリズマブ|薬物：シスプラチン|薬物：ゲムシタビン
NCT03738800	薬物：CD5789 クリーム 200Åμｇ／ｇ|薬物：CD5789 クリーム 100Åμｇ／ｇ|薬物：CD5789 クリームビヒクル
NCT02842021	薬物：　S2G6T-1|Drug: S2G6T-2|薬物：　S2G6T-3|薬物：　S2G6T-4
NCT02630901	薬物：　?RX003|その他：プラセボ
NCT00816413	薬物：シクロスポリン|薬物：ミコフェノール酸モフェチル|薬物：ベントスタチン|遺伝子的：細胞遺伝学的分析|遺伝子的：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション|遺伝子的：タンパク質分析|その他：フローサイトメトリー|その他：免疫酵素技法|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：監施度移植コンディショニング処置|処置：非骨髄破壊性同種異系造血幹細胞移植|処置：末梢血液幹細胞移植（PBSC）|放射線：全身照射
NCT03139981	薬物：　ASN002|薬物：プラセボ経口錠剤
NCT03349060	薬物：　PF-04965842 100 mg|薬物：　PF-04965842 200 mg|薬物：プラセボ
NCT03259620	薬物：　CLS006|薬物：CLS006 ビヒクル
NCT03721172	[薬物：アブレミラスト|その他：プラセボ
NCT02611804	薬物：ジクロフェナクナトリウム|薬物：プラセボ
NCT02303821	薬物：カルフィルゾミブ|デキサメタゾン|薬物：ミトキサントロン|薬物：PEG-アスパラギナーゼ|薬物：ピンクリスチン|薬物：髄腔内（IT）メトトレキサート|薬物：髄腔内トリプル療法（髄腔内シタラビン、ヒドロコルチゾン、及びメトトレキサート）|薬物：6-メルカプトプリン|薬物：シクロホスファミド|薬物：シタラビン|薬物：ダウノルビシン
NCT03443024	生物学的：レブリキズマブ|薬物：プラセボ
NCT02780167	薬物：　PF-04965842|薬物：プラセボ
NCT03127956	[薬物：オルマコスタットグラサレチルジェル、5.0%

【図１９Ｐ】

NCT番号	介入
NCT03073486	薬物：オルマコスタットグラサレチルジェル、5.0%|その他：オルマコスタットグラサレチルジェル、ビヒクル
NCT04015700	生物学的：Geneos　Therapeutics によって供給されたパーソナライズ化ネオ抗原 DNA ワクチン|デバイス：Geneos　Therapeutics によって供給された CELLECTRAÅ（登録商標）2000EP デバイス|医薬
NCT02640625	栄養補助食品：プロバイオティクス化合物
NCT03449108	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己腫瘍浸潤性リンパ球 LN-145|薬物：自己腫瘍浸潤性リンパ球 LN-145-S1|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|その他：生活の質の評価|その他：アンケート管理
NCT03969446	薬物：ゲシタビン|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT02716233	薬物：ペグアスパラガーゼ 1250IU/m2×2|薬物：ペグアスパラガーゼ 2500IU/m2×1
NCT04419467	生物学的：CSL346|薬物：プラセボ
NCT03921021	薬物：テロメリシン
NCT03361800	薬物：エンチノスタット
NCT02965716	生物学的：ペンブロリズマブ|生物学的：タリモジンラヘルパレプベク
NCT04911621	生物学的：樹状細胞ワクチン接種+テモゾロミドベースの化学放射線|生物学的：樹状細胞ワクチン接種+従来の第二選択治療
NCT04930055	生物学的：COVID-19 ワクチン接種
NCT01712945	薬物：パリフェルミン|薬物：アレムツズマブ
NCT00521339	薬物：アプレミラスト
NCT00217763	薬物：　3APS
NCT03357757	薬物：バルプロ酸|生物学的：アベルマブ
NCT03082534	薬物：ペンブロリズマブ、セツキシマブ
NCT04858607	診断検査：血液試料|診断検査：唾液試料
NCT03615105	放射線：超分割全身放射線照射|薬剤：チオテパ|薬物：シクロホスファミド|薬物：ブスルファン|薬物：フルダラビン|薬物：メルファラン|薬物：クロファラビン|処置：HPC（A）幹細胞同種異系移植|薬物：リツキシマブ|デバイス：ウサギ抗胸腺細胞グロブリン
NCT01757639	生物学的：イピリムマブ|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT00852618	
NCT02963610	薬物：レナリドマイド|薬物：ペンブロリズマブ
NCT02027610	
NCT03601455	生物学的：デュルバルマブ|放射線：外部ビーム放射線療法|生物学的：トレメリムマブ
NCT03634332	薬物：P6GPH2N|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT02536794	生物学的：抗 B7H1 モノクローナル抗体 MEDI4736|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：薬理学的試験|生物学的：トレメリムマブ
NCT01579318	生物学的：タボキノゲンテルセプラスミド（tavo）|デバイス：OncoSec メディカルシステム
NCT02978625	その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：ニボルマブ|生物学的：タリモジンラヘルパレプベク
NCT04301076	薬物：シクロホスファミド|薬物：ドキソルビシン塩酸塩|薬物：ニトボン|薬物：レナリドマイド|薬物：プレドニゾン|薬物：硫酸ビンクリスチン
NCT02860559	生物学的：TBX-1400
NCT02981914	薬物：ペンブロリズマブ
NCT02215707	生物学的：PISPZ ワクチン
NCT03852823	薬物：　SG001
NCT04300244	生物学的：UV1 ワクチン+ロイシン|生物学的：イピリムマブ|生物学的：ニボルマブ

10 20 30 40 50

【図１９Ｑ】



NCT番号	介入
NCT03812549	薬物：シンチトップ放射線；前立腺放射線療法治療後；長期安全性検査
NCT04120454	生物学的：ペムブロリズマブ|生物学的：ラムシルマブ
NCT03526185	薬物：組換皮膚炎ワクチン単独療法：ニボルマブおよびイピリムマブ
NCT04630353	薬物：HB-201 (T)|薬物：HB-201 IV
NCT01479296	生物学的：VRCDA05 ワクチン（gag-pol/env A/B/C）|生物学：rAd5 env A|生物学：rAd5 env C|生物学：rAd5 gag-pol|生物学：プラキボワクチン
NCT03007147	処置：同種異系造血幹細胞移植後療法：シクロホスファミド|薬物：シタラビン|薬物：ダウノルビシン脂肪酸複合物：デキサメタゾン|薬物：デクスラゾキサン塩酸塩水和物：ドキソルビシン塩酸塩リポソーム注射剤|薬物：エトポシド|薬物：イホスファミド|薬物：メトトレキサート|薬物：メチルプレドニゾロン琥珀酸ナトリウム|薬物：ペグアスパルガーゼ|薬物：プレドニゾロン|その他：アンケート管理|薬物：抗胸腺細胞グロブリン|薬物：チオグアニン|薬物：破傷風トキソイドワクチン
NCT03389802	生物学的：死滅又は縮小時の原発性悪性 CNS 腫瘍患者のための APXiO0M 治療に有効な：新たに診断された DIPG 患者のための APXiO0M 治療
NCT02129075	DAC-205/NY-ESO-1 融合タンパク質 COX-1401|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：ネオ抗原ペースのメタノーマ・ポリ-ICLC ワクチン|その他：臨床学的試験|生物学的：最小残存病
NCT03220022	薬物：シクロホスファミド|薬物：ドキソルビシン塩酸塩脂質複合物：ニボルマブ|生物学的：フィルグラスチム|薬物：イプルツモブ|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学的：ペグフィルグラスチムその他：実質
NCT01976182	薬物：メトトレキサート|薬物：シクロホスファミド
NCT03083158	薬物：自制形ガチテン
NCT00086359	薬物：組織プラスミノゲン、ヨウ素プシン、ヨウ素プシン誘導体：ヨウ素プシンポリアデン誘導体：ヨウ素ウシポリトリエル
NCT03475134	その他：TIL 療法|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：インターロイキン－２|薬物：ニボ
NCT04659486	行動：在宅ニクサイズトレーニング
NCT02869295	薬物：INCTR-214
NCT04810910	生物学的：INO-VAC-P01|その他：GM-CSF
NCT03862815	生物学的：INO-VAC-P01|その他：GM-CSF
NCT02775851	生物学的：ペムブロリズマブ|処置：放射線治療|手術
NCT04193189	生物学的：HIPPUSAV-B|生物学的：ENGEBUDCB
NCT03739995	薬物：抗ヨウボヴタジェル（CAR）療法：メトレキシド|放射線療法|免疫療法（NKTI）療法：抗神経内分泌細胞抗体ボボタジェル（CAR－tAA）治療学的：VICKO-SELS|薬物：療法ケア（OC）抗：AET
NCT03705169	生物学的：SAR441236|生物学的：ブラセボ|薬物：抗レトロウイルス治療
NCT03635788	薬物：膵癌ケア（SOC）抗：AET|薬物：抗：IPOI|薬物：抗：CAR|薬物：RPVー1A 療法用高濃縮：CAB－1A 維持用高濃縮：CAB－1A 維持用
NCT03560258	生物学的：pJ4CE1/2　pDNA ワクチン|生物学的：金属 p53^{mut}neu　pDNA ワクチンと組合した pJ4CE1/2　pDNA ワクチン|生物学的：金属 p53^{mut}neu　pDNA ワクチン|生物学的：金属 p53^{mut}neu　pDNA ワクチン
NCT03003676	生物学的：ONCOS-102|薬物：シクロホスファミド|薬物：ペンブロリズマブ
NCT04375527	薬物：ヒト-メチオニン|生物学的：ニボルマブ|その他のアンケート管理
NCT03123055	薬物：B-701|薬物：ペンブロリズマブ
NCT02344290	薬物：ピタバスタチン療法：プラセボ
NCT01949116	薬物：LDMTX|薬物：プラセボ|医療機器療法：実験
NCT01266616	生物学的：Proleukin　IRV　MAG　pDNA ワクチン|生物学的：IL-12|その他：プラセボ

【図１９Ｒ】

NCT番号	介入
NCT01482767	薬物：ペメトレキシン－シスプラチン－ラルチトレキシド|生物学的：DRV）療法：ラパミラ（DRV）療法：ボセプレビル（DOC）
NCT00560872	薬物：ラルチトレキシド療法：ゴルビルダビン|その他：プラセボ|薬物：ゴルビルダビン療法：ペグインターフェロンアルファ療法
NCT00537394	薬物：ニンテダニブ療法：ラルチトレキシド療法：ダカルバジン療法：ゲムシタビン療法：ペメトレキシド
NCT04212415	薬物：レンバレニブ
NCT00082498	薬物：SCH-X(X)ワクセの療法：プラセボ
NCT02788916	その他：介入なし
NCT03836660	生物学的：CD63-Tm
NCT03318562	薬物：eFT508
NCT04068194	薬物：アベルマブ療法併用：放射線治療併用：ゲムシタビン＋ナブパクリタキセル療法：ペメトレキシド
NCT03206047	薬物：ブリナツモマブ|薬物：DEC-205/NY-ESO-1 融合タンパク質 COA-101|薬物：グリアゾラセトの併用：抗薬剤バイオマーカー分析療法：ポリ ICLC
NCT03854033	生物学的：ニボルマブ|生物学的：IDO1 阻害剤 BMS-986205|処置：造血幹細胞移植
NCT04214249	薬物：シタラビン療法：ダウノルビシン脂肪酸複合物：造血幹細胞移植療法：イダルビシン脂肪酸生物学的：ペンブロリズマブ
NCT03358554	生物学的：セツキシマブ|生物学的：ゲムシルバルマブ抗幹細：強度変調放射線療法|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：生活の質の評価|その他：アンケート管理
NCT02027805	生物学的：T-Guard
NCT03065023	薬物：MK-4621
NCT04387071	生物学的：アゴニスト抗 CD40 モノクローナル抗体 INCAGN01949|薬物：VLP カプセル化 TLR9 アゴニスト CMP-001
NCT03055013	処置：従来の手術|生物学的：ニボルマブ|その他：患者報酬|その他：生活の質の評価|その他：アンケート管理
NCT04254419	生物学的：NK 細胞
NCT02386554	薬物：ニボルマブ
NCT03600155	生物学的：イピリムマブ|生物学的：ニボルマブ
NCT03578575	薬物：Dengue Bacon Tmg|薬物：プラセボ
NCT04130763	生物学的：FMT カプセル
NCT02566488	薬物：細胞傷害性抗腫瘍剤
NCT02506332	薬物：ペンブロリズマブ|パクリタキセル|薬物：プラセボ|薬物：ゲムシタビン
NCT04215146	薬物：パクリタキセル白蛋白懸濁注射液|ペクレキシン|薬物：アベルマブ
NCT03610490	生物学的：自己腫瘍浸潤性リンパ球 MDA-TIL|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：インターロイキン-2|その他の生活の質の評価
NCT03007238	生物学的：アルゴスロイキン|処置：核外照射|その他|学術|検査室バイオマーカー分析|その他：生活の質の評価
NCT03605238	生物学的：ヨルゴエタロイド&nanCAR19/20
NCT03277209	薬物：プレリキナフォル
NCT02924038	生物学的：IMA950|生物学的：ポリ ICLC|生物学的：バルリルマブ
NCT02399371	生物学的：ペンブロリズマブ|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：実験デノム実験
NCT04260529	薬物：CyPep-1
NCT03556997	薬物：ペンブロリズマブ

【図１９Ｓ】

NCT番号	介入
NCT03436941	薬物：パルボシリブ療法
NCT02453620	薬物：ニンテダニブ|生物学的：イピリムマブ|その他：ニボルマブおよびその他：薬理学的試験
NCT04459078	薬物：ネムリトタビン療法：アルブミンシリクタキセル（Albumin Paclitaxel）療
NCT03914300	薬物：カボザンチニブ-Sトシレート療法|生物学的：イピリムマブ|生物学的：ニボルマブ
NCT02950259	薬物：ソラフェニブトシレート|インドスキシンエタノグルコン酸塩結晶|その他：マルチビタミン
NCT02465221	生物学的：TA-CIN（組）|生物学的：TA-CIN（大腸）
NCT03450687	その他：検査室バイオマーカー分析|放射線：タリモジンラベルパンデクタ
NCT04091867	薬物：化学療法を伴う aspasta-tiaA3 療法：セツキシマブ|放射線：放射線療法
NCT04926948	その他：免疫療法|その他：生活の質の評価|放射線：密封放射線療法
NCT04284787	薬物：アダキシン注射剤：ペンブロリズマブ療法：ニトロクラス
NCT03653052	薬物：デュルバルマブ
NCT03538899	薬物：Abraxane（パクリタキセルアルブミン結合粒子）|CD4 抗体システタキセルおよびシーケーデーディバ療法：プラムクアン
NCT03483502	放射線治療|放射線治療|実験：ニボルマブ
NCT03385226	薬物：ペンブロリズマブ|放射線：放射線療法
NCT04577807	生物学的：PVSRIPO|生物学的：抗 PD－1 チェックポイント阻害剤

【図２０Ａ】

NCT番号	介入
NCT04729543	生物学的：自己 MCL TCR　T 細胞による養子療法
NCT03925896	薬物：LMP2 抗原特異的 TCR T 細胞
NCT04476251	生物学的：EP TCR
NCT02654821	生物学的：TCR 形質導入 T 細胞|処置：在宅処置：採血
NCT04368182	生物学的：自己 C-TCR055
NCT04015336	生物学的：EP TCR
NCT04049950	生物学的：EP TCR
NCT03326921	生物学的：CD8+及び CD4+ドナー＞メモリー T 細胞急発性 HA1 特異的 TCR|薬物：フルダラビン|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT03971747	生物学的：AEP 特異的下顎胞状変形 E 細胞
NCT04677088	生物学的：TCR-T 細胞
NCT03778814	生物学的：TCR-T 細胞
NCT02550535	遺伝子的：自己 WT1　TCR 形質導入 T 細胞
NCT04411134	生物学的：EP TCR
NCT02986258	遺伝子的：CMV-TCR 形質導入ドナー由来 T 細胞
NCT04146298	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：高異体 KRAS　G12V 特異的 TCR 形質導入自己 T 細胞|薬物：抗 PD-1 モノクローナル抗体
NCT03462316	生物学的：NY-ESO-1/LY-TCR 遺伝的修飾造血幹細胞移植後の T 細胞療法	‥ ‰
NCT03029273	薬物：シクロホスファミド|フルダラビン|生物学的：抗 NY－ＥＳＯ－１　ＴＣＲ形質導入 T 細胞
NCT03899415	生物学的：TCR 抗胎内性 T 細胞
NCT03047811	その他：TCR-T 細胞療法
NCT03937791	生物学的：EP　T 細胞受容体（ＴＣＲ）
NCT03648697	生物学的：EBV-TCR-TCYT-E003)細胞
NCT02686372	その他：生物学的：HBV 活原発胸 TCR 特異的性 T 細胞
NCT01810120	生物学的：TCR アルファベータ T 細胞形成
NCT04153279	生物学的：CMV-TCR-T 細胞
NCT03197025	薬物：アルデスロイキン|生物学的：抗　T 細胞受容体（ＴＣＲ）
NCT02719782	生物学的：生物学的：TCR-T
NCT04156217	生物学的：EBV-TCR-T 細胞
NCT01621724	遺伝子的：ＷＴ１　ＴＣＲ形質導入 T 細胞
NCT03575767	その他：骨髄破壊的造血幹細胞移植
NCT02327351	その他：生物学的：TCR アルファベータ T 細胞結紮
NCT04130057	薬物：抗 PD1 自己活性化エレメントを有する EBV 特異的 TCR-T 細胞
NCT04356469	生物学的：ハプロタイプ一致の造血幹細胞移植
NCT04414046	生物学的：ハプロタイプ一致の造血幹細胞移植
NCT03980691	生物学的：ＣＡＲ－ＴＸ以下ＴＣＲ－Ｔ細胞療法を伴うナダミド
NCT03891706	薬物：細胞移植前の TCR-T 細胞|薬物：インターロイキン－２|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド

【図２０Ｂ】

NCT番号	介入
NCT03578406	薬物：HPV　E6 特異的 TCR-T 細胞
NCT04745403	薬物：mRNA　HBV/TCR　T 細胞
NCT01694472	生物学的：ＭＡＧＥ－Ａ４　ＴＣＲ遺伝子改変Ｔ細胞
NCT02200718	生物学的：Ｎｅｕｒｏｖａｘ|生物学的：IFA 不完全フロインドアジュバント
NCT04509726	薬物：ＩＬ１２自己分泌性エレメントを有するＬＭＰ２特異的ＴＣＲ－Ｔ細胞
NCT01982266	デバイス：　　Iâ„¢Ç 放固節金軟骨置換術(TCR)　　â„¢Ç
NCT03747484	生物学的：自己ＭＣＰｙＶ特異的ＨＬＡ－Ａ０２制限ＴＣＲ形質導入ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞　ＦＨ－ＭＣＶＡ２ＴＣＲ|薬物：アベルマブ|生物学的：ペンブロリズマブ|放射線：放射線療法
NCT02858310	生物学的：E7　TCR 細胞|薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT02775292	生物学的：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：ニボルマブ|生物学的：NY-ESO-1 反応性 TCR レトロウイルスベクター形質導入自己 PBL|生物学的：ＮＹ－ＥＳＯ－１（１５７－１６５）ペプチドパルス化自己樹状細胞ワクチン|処置：ポジトロン放出断層撮影
NCT04809766	生物学的：自己メソテリン特異的ＴＣＲ－Ｔ細胞|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT03431311	生物学的：養子細胞療法（ACT）
NCT03717480	デバイス：CliniMAC
NCT04614571	栄養補助食品：グルテン粉末
NCT00910650	生物学的：ＦＳ　ＴＣＲトランスジェニック細胞及びＭＡＲＴ－１ペプチドパルス化樹状細胞|薬物：非骨髄破壊的コンディショニング化学療法
NCT04464889	薬物：MDG1021　用量 1|薬物：MDG1021　用量 2|薬物：MDG1021　用量 3|薬物：MDG1021　最適用量
NCT03545815	生物学的：抗メソテリン CAR-T 細胞
NCT03503968	薬物：MDG1011|その他：治験責任医師選択療法
NCT03240861	その他：18F-FHBG|生物学的：アルデスロイキン|薬物：プスルファン|生物学的：細胞療法|処置：コンピュータ断層撮影|生物学的：フィルグラスチム|薬物：フルダラビン|処置：自由意アフェレーシス|薬物：プレリキサフォル|処置：ポジトロン放出断層撮影
NCT03941626	生物学的：CAR-T/TCR-T 細胞免疫療法
NCT03228368	薬物：アテゾリズマブ（MPDL3280A）
NCT00393029	生物学的：抗タンパク質 53 又は腫瘍タンパク質 53(p53)T 細胞受容体形質導入末梢血リンパ球|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：フィルグラスチム|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT03506802	放射線：18F-FHBG|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：細胞療法|処置：コンピュータ断層撮影|生物学的：フィルグラスチム|その他: 検査室バイオマーカー分析|薬物：レナリドマイ 円|処置：自由意アフェレーシス|薬物：メルファラン|薬物：プレリキサフォル|処置：ポジトロン放出断層撮影
NCT04878484	生物学的：TCRT-ESO-A2
NCT03691376	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己 NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性ＴリンパＴ球|その他：細胞療法|薬物：メルファラン
NCT00509496	薬物：リン酸フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己抗 gp100：154～162　Ｔ細胞受容体遺伝子操作腫瘍浸潤性リンパ球|生物学的：自己抗 gp100：154～162ＴＴ細胞受容体遺伝子操作末梢血リンパ球
NCT02457650	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：抗ＮＹ　ＥＳＯ－１　ＴＣＲ形質導入Ｔ細胞
NCT01967823	生物学的：[illegible]|薬物：[illegible]
NCT04639245	薬物：アテゾリズマブ|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：MAGE-A1 特異的Ｔ細胞受容体形質導入自己Ｔ細胞|生物学的：Pd1 阻害剤

【図２０Ｃ】

NCT番号	介入
NCT03301168	生物学的：BPX-501　T 細胞|薬物: リミデュシド
NCT03939585	生物学的：細胞療法生成物
NCT02065869	生物学的：BPX-501　T 細胞|薬物：リミデュシド
NCT03391791	遺伝子的：遺伝子操作した T 細胞受容体
NCT00509288	生物学的：自己抗ＭＡＲＴ－１　Ｆ５　Ｔ細胞受容体|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己抗ＭＡＲＴ－１　Ｆ５　Ｔ細胞受容体遺伝子操作した腫瘍浸潤性リンパ球
NCT03354390	生物学的：細胞注入
NCT02030847	生物学的：CART-19
NCT00991224	生物学的：ＷＴ－ｇａｇ－ＴＣＲ改変Ｔ細胞|生物学的：Ｉ±ß-gag-TCR 改変Ｔ細胞|その他：STI 又は休薬日
NCT03047746	デバイス：CliniMAC
NCT03019809	生物学的：HSCT 前のコンディショニングのための G-CSF。|生物学的：HSCT 前のコンディショニングのためのプレリキサフォ
NCT02280811	薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：E6 TCR|薬物：アルデスロイキン
NCT04194190	薬物：個々の患者ＴＣＲ形質導入ＰＢＬ
NCT02153905	薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：HLA-A　A 血清型群(HLA-A*01)内の抗 MAGE-A3 ヒト自血球抗原血清型-制限Ｔ細胞受容体(TCR)
NCT02057159	生物学的：ＮｅｕｒｏＶａｘ|生物学的：IFA プラセボ
NCT00610311	薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：ALVAC　gp100 ワクチン|生物学的：抗 gp100：154～162　Ｔ細胞受容体（TCR）末梢血リンパ球（PBL）
NCT02070406	薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン|生物学的：NY-ESO-1 反応性 TCR レトロウイルスベクター形質導入自己 PBL|生物学的：樹状細胞ワクチン療法|生物学的：アルデスロイキン|放射線：フルオキシグルコース F18|処置：ポジトロン放出断層撮影|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT02149706	生物学的：ＮｅｕｒｏＶａｘ|生物学的：IFA 不完全フロインドアジュバント
NCT04616482	行動：デジタル治療説泳化物制限（TCR）プログラム
NCT00612222	生物学的：自己抗ＭＡＲＴ－１　ＦＳ　Ｔ細胞受容体遺伝子操作された末梢血リンパ球|生物学的：ALVAC　MART-1 ワクチン|生物学的：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT02111850	生物学的：抗 MAGE-A3-DP4　TCR　PBL|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン
NCT00923390	遺伝子的：2G-1 TCR レトロウイルスベクター形質導入リン|薬物：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：(PG13-A(F/K-F-SiSG-T2a-B(opt)(2G-1　TCR)レトロウイルスベクター形質導入リンパ球
NCT01273181	生物学的：PG13-MAGE-A3　TCR9W11（抗 MAGE-A3/12　TCR）形質導入自己末梢血リンパ球|薬物：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT02623582	生物学的：自己抗 CD 123　CAR　TCR/4-1BB 発現性ＴリンパＴ球|薬物：シクロホスファミド
NCT04379466	
NCT02366546	薬物：　TBI-1301	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT04665388	
NCT02096614	薬物：　TBI-1201	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT00670748	生物学的：抗ＮＹＥＳＯ－１　Ｔ細胞受容体ＰＢＬ|薬物：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン|生物学的：ALVAC　NY　ESO-1 ワクチン

【図２０Ｄ】

NCT番号	介入
NCT01697527	生物学的：アルデスロイキン|薬物：リン酸フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学的：NY-ESO-1 反応性 TCR レトロウイルスベクター形質導入自己 PBL|生物学的：樹状細胞ワクチン療法|放射線：フルデオキシグルコース F18|処置：ポジトロン放出断層撮影
NCT02869217	薬物：シクロホスファミド|生物学的：TBI-130|薬物：フルダラビニ
NCT01350401	遺伝子的：自己遺伝子改変Ｔ細胞、　　NY-ESO-1á¶œÆ²âµâ³Ť
NCT01306188	生物学的：乳がんコホート|生物学的：肺がんコホート
NCT02646839	デバイス：CliniMacs TCR アルファ-ベータ-ピオチンシステム
NCT04102436	薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|薬物：アルデスロイキン|生物学的：スリーピングビューティー転置 PBL
NCT02652468	薬物：リン酸フルダラビン|薬物：メスナ|薬物：シクロホスファミド|放射線：全結節照射|生物学的：Ｔ細胞枯渇造血幹細胞移植|処置：同種異系造血幹細胞移植|処置：末梢血幹細胞移植|薬剤：ミコフェノール酸モフェチル|薬物：タクロリムス|生物学的：リツキシマブ
NCT03159585	薬物：　TAEST16001
NCT03638206	生物学的：CAR-T 細胞免疫療法
NCT02337595	生物学的：CD45RA-枯渇末梢血単核細胞
NCT04680416	
NCT04249830	生物学的：同種異系幹細胞移植|デバイス：CliniMACS　TCR　Ï±/Ï² 試薬キット及び CliniMACS　CD19
NCT00923806	生物学的：PG13-CEA_TCR（抗 CEA　TCR　PBL）|薬物：アルデスロイキン
NCT02062359	生物学的：抗ＮＹ　ＥＳＯ－１　Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）分化抗原群６２Ｌ（ＣＤ６２Ｌ）＋細胞|薬物：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT02743611	生物学的：BPX-701|薬物：リミデュシド
NCT01029366	生物学的：CART-19
NCT04520711	生物学的：TCR-形質導入Ｔ細胞|薬物：CDX-1140|薬物：ペンブロリズマブ
NCT04323657	薬物：TC-110　T 細胞|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT03907852	薬物：gavo-cel|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：抗 PD1
NCT01892293	薬物：NY-ESO-1c259 改変Ｔ細胞による治療
NCT04536922	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン|薬物：ペムブロリズマブ（KEYTRUDA（登録商標））|生物学的：個々の患者ＴＣＲ形質導入ＰＢＬ
NCT01352286	遺伝子的：自己遺伝子改変Ｔ細胞
NCT00704938	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：抗 p53　Ｔ細胞受容体形質転換末梢血リンパ球|生物学的：自己樹状細胞_アデノウイルス p53 ワクチン|生物学的：フィルグラスチム|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT02650986	薬物：シクロホスファミド|薬物：デシタビン|その他：検査室バイオマーカー分析|処置：自血球アフェレーシス|生物学的：TGFbDNRII 形質導入自己腫瘍浸潤性リンパ球
NCT03399448	生物学的：ＣＲＩＳＰＲ編集した内因性ＴＣＲ及びＰＤ－１を用いたＮＹ－ＥＳＯ－１再指向性自己Ｔ細胞|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|デバイス：NY-ESO-1 発現試験
NCT02774291	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：抗サイログロブリン mTCR 形質導入自己末梢血リンパ球|薬剤：シクロホスファミド|生物学的：フィルグラスチム|薬物：リン酸フルダラビン|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT03297697	処置：腫瘍生検|処置：末梢血採血|処置：リンパトラック TCR クローン性アッセイ
NCT01567891	生物学的：NYESO-1c259　T 細胞

【図２０Ｅ】

NCT番号	介入
NCT03970382	生物学的：NeoTCR-P1 養子細胞療法|生物学的：ニボルマブ|生物学的：IL-2
NCT03579875	薬物：全身照射（TBI）（プラン 1）|薬物：シクロホスファミド（CY）（プラン 1）|薬物：フルダラビン（FLU）|薬物：メチルプレドニゾロン（MP）|デバイス：ドナー動員した PBSC 注入|薬物：G-CSF|薬物：シクロホスファミド（CY）（プラン 2）|薬物：リツキシマブ|薬物：プスルファン
NCT03412877	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン|生物学的：個々の患者 TCR 形質導入 PBL|薬物：ペンブロリズマブ（KEYTRUDA）
NCT03441100	薬物：IMA202 生成物|デバイス：IMA_Detect
NCT03247309	生物学的：IMA201 製品|診断テスト：IMA_Detect
NCT01457131	薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|その他：IL-12&抗 NY　ESO1　TCR　PBL
NCT00001350	
NCT03686124	生物学的：IMA203 生成物|デバイス：IMADetect|薬物: アテゾリズマブ
NCT00411723	薬物：ＲＴＬ１０００（組換えＴ細胞受容体リガンド）|薬物：RTL1000 プラセボ
NCT00923195	薬物：MART-1: 26～35(27L)ペプチド|薬物：モンタニド ISA 51 VG|薬物：gp100：154～162 ペプチド|処置：放射線|薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|遺伝子的：抗 gp100:154　TCR　PBL|遺伝子的：抗 MART-1F5　TCR　PBL
NCT00753051	薬物：クロザピン+ハロペリドール|薬物：クロザピン、電気けいれん療法
NCT03996018	その他：T 細胞リンパ球応答
NCT00499070	遺伝子的：ポリメラーゼ連鎖反応|その他：フローサイトメトリー|その他：免疫学的技法|処置：生検
NCT03139370	薬物：KITE-718|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|デバイス：MAGE-A3/A6 スクリーニングテスト
NCT04135092	生物学的：個々の患者 TCR 形質導入 PBL|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン|薬物：ペンブロリズマブ
NCT03709706	薬物：レテトレスゲンアウトルーセル|薬物：ペンブロリズマブ
NCT02820259	薬物：タクロリムス
NCT04806347	生物学的：ＴＣＲÎ±Î²＋／ＣＤ１９＋枯渇した造血幹細胞（ＨＳＣ）移植片／デバイス：CliniMACSÂ（登録商標）システム
NCT04746209	デバイス：アルファ／ベータＴ細胞及びＢ細胞枯渇ＨＣＴ|薬物：ブリナツモマブ
NCT02870244	生物学的：漸増用量
NCT03615144	薬物：メルファラン|薬物：チオテパ|薬物：クロファラビン|薬物：フルダラビン|薬物：抗胸腺細胞グロブリン{ウサギ}(Thymoglobulin® (登録商標))|処置：CliniMACS 試薬
NCT03236558	処置：血液収集
NCT03603002	診断検査：SABR 後生検
NCT02508038	処置：TCRÎ±Î²+/CD19+枯渇したハプロタイプ一致の HSCT|薬物：ゾレドロネート
NCT03250325	生物学的：TBI-1301|薬物：シクロホスファミド
NCT02040337	
NCT03422224	診断検査：混合リンパ球反応
NCT01218867	生物学的：抗 VEGFR2　CAR　CD8 プラス PBL|薬物：シクロホスファミド|生物学的：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン
NCT01586403	生物学的：用量 1|生物学的：用量 2|生物学的：用量 3|生物学的：用量 4
NCT00087594	薬剤：ペグインターフェロンアルファ-2a[ペガシス]|薬剤：リバビリン
NCT04526509	薬物：　GSK3901961 |薬物：　GSK3845097 |薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT03745326	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン|生物学的：抗 KRAS　G12D　mTCR　PBL

【図２０Ｆ】

NCT番号	介入
NCT03190941	薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|生物学的：抗 KRAS　G12V　mTCR　PBL|薬物：アルデスロイキン
NCT02390739	薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：抗サイログロブリン mTCRPBL
NCT04364828	遺伝子的：全ゲノム解析|遺伝：Ｔ細胞受容体（TCR）レパートリー|遺伝子的：SARS-CoV-2 ウイルス組成物
NCT03145545	デバイス：ＣｌｉｎｉＭＡＣＳデバイスを使用したアルファ／ベータＴ及びＣＤ１９＋
NCT02277522	生物学的：RNA 抗 CD19　CAR　T細胞
NCT00085930	生物学的：EBV 特異的 CTL
NCT01583686	薬物：フルダラビン|生物学的；抗メソテリンキメラＴ細胞受容体（ＣＡＲ）形質導入末梢血リンパ球（ＰＢＬ）|薬物：シクロホスファミド|薬物：アルデスロイキン
NCT02748902	薬物：インダノールメブデート 0.05%ゲル
NCT03733249	薬物：リミデュシ|生物学的;リボゲンレクロイセル
NCT03639844	生物学的：リボゲンレクロイセル|薬物：リミデュシド
NCT01747486	生物学的：CART-19
NCT02624258	生物学的：ＣＤ１９　ＲＮＡ再指向性自己Ｔ細胞（ＲＮＡ　ＣＡＲＴ１９細胞）
NCT04640987	生物学的：同種異系幹細胞移植|デバイス：CliniMACS　Prodigy　System|薬物：T-allo10 細胞アドバック
NCT03017131	生物学的：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：デシタビン|生物学的：遺伝子操作した NY-ESO-1 特異的Ｔリンパ球|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT01154387	薬物：抗胸腺細胞グロブリン|薬剤：TOL101|薬物：ステロイド|薬物：ミコフェノール酸モフェチル（MMF）
NCT01551043	生物学的：CART-19
NCT03336567	その他：電話インタビュー
NCT04558736	薬物：抗胸腺細胞グロブリン(ウサギ)|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|薬物：メスナ|薬物：G-CSF|放射線：総リンパ照射（TLI）|デバイス：CliniMACS|生物学的：HPC、注入|生物学的：CD45RA 枯渇 DLI
NCT00852527	
NCT03587376	薬物：アダベセスタット
NCT02588612	薬剤：レテトレスゲンアウトルーセル(GSK3377794)|薬剤：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT03634683	生物学的：LioCyx
NCT01700192	生物学的：MK-8237 錠剤|生物学的：プラセボ錠|薬物：レスキュー治療：自己注射可能なエピネフリン|薬物：レスキュー治療：ロラタジン錠剤|薬物：レスキュー治療：オロパタジン点眼薬|薬物：レスキュー治療：モメタゾンフロエート鼻腔スプレー
NCT03912831	薬物：KITE-439|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン
NCT04245124	その他：戦略記憶高度推論トレーニング|その他：伝統的な認知リハビリテーション
NCT04402892	その他：血液 35ml、毎回ヘパリン酸リチウム５チューブ（入院患者）|その他：血液 35ml、毎回リチウムヘパリネート５チューブ（治癒した患者）
NCT02055521	処置：血液試料、生検
NCT04650724	薬物：BCMA キメラ抗原受容体を標的とするＴ細胞注入剤
NCT01982890	その他：対照
NCT04858828	
NCT04447053	薬物：ベリムマブ注射液[Benlysta]
NCT03649529	生物学的：GPA-TriMAR-T

【図２０Ｇ】

NCT番号	介入
NCT02770820	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己 WT1-TCRc4 遺伝子導入 CD8 陽性 Tcm/Tn リンパ球|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT03132792	遺伝子的：自己遺伝子改変　AFPâ¶œÃ²Ã³Ã²ＴＴ細胞
NCT03392545	併用製品：免疫アジュバントと放射線の組み合わせ
NCT04636047	その他：遺伝子変異検出の方法
NCT04494893	
NCT04906382	処置：生検|薬物：カルボプラチン|薬物：パクリタキセル|生物学的：チスレリズマブ
NCT00706992	生物学的：ALVAC-MART-1 ワクチン|生物学的：MART-1:26-35(27L)-ペプチドワクチン|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己抗 MART-1F5　Ｔ細胞受容体遺伝子操作した末梢血リンパ球|生物学的：不完全フロインドアジュバントとアジュバント
NCT04201873	生物学的：樹状細胞腫瘍細胞溶解ワクチン|生物学的：ペンブロリズマブ|その他：プラセボ投与|薬物：ポリＩＣＬＣ
NCT04692948	その他：キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ｃａｒ－ｔ）
NCT02636855	
NCT03409796	栄養補助食品：グルテン
NCT04318964	生物学的：TAEST16001 細胞
NCT00091104	生物学的：MART-1:27~35 ペプチドワクチン|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：フィルグラスチム|生物学的：不完全フロインドアジュバント|生物学的：治療用自己リンパ球|生物学的：治療用腫瘍浸潤性リンパ球|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT00085462	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：フィルグラスチム|生物学的：gp100-腫瘍ワクチン|生物学的：治療用自己リンパ球|生物学的：治療用腫瘍浸潤性リンパ球|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン
NCT01284504	薬物：セレコキシブ|その他：プラセボ
NCT02408016	生物学的：アルデスロイキン|生物学的：自己 WT1-TCRc4 遺伝子導入 CD8 陽性 Tcm/Tn リンパ球|薬物：シクロホスファミド|その他：検査室バイオマーカー分析|処置：治療的従来手術
NCT01370213	薬物：調製レジメン|生物学的：NK 細胞|薬物：インターロイキン-2|生物学的：CD34 グラフト/抗胸腺細胞グロブリン|生物学的：ドナーTCR±/β-枯渇グラフト/ATG
NCT03453801	生物学的：FluzoneÂ（登録商標）|生物学：FluMistÂ（登録商標）
NCT03156101	生物学的：BinD19
NCT03265106	生物学的：BinD19
NCT04222595	その他：Fluenz　Tetra 鼻スプレー懸濁液
NCT02571166	生物学的：HSV529|薬物：パラシクロビル
NCT01640301	生物学的：アルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：リン酸フルダラビン|その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：WT1 感作同種異系ＴリンパＴ球
NCT02340845	生物学的：プロメライン及びヨモサイン
NCT02942173	生物学的：CD45RA-枯渇末梢血単核細胞
NCT04534322	薬物：メルファランフルフェナミド|薬物：デキサメタゾン
NCT03738228	薬物：アテゾリズマブ|放射線：近接照射療法|薬物：シスプラチン|放射線：放射線療法
NCT04877613	薬物：単回用量の CART-GFRa4 細胞|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT03369353	

【図２０Ｈ】

NCT番号	介入
NCT03365661	生物学的：ALT-803
NCT04646837	薬物：デュルバルマブ|薬物：アルブミンパクリタキセル|薬物：カルボプラチン|シスプラチン
NCT02617108	デバイス：フォーリーバルーン
NCT02809560	処置：高張性血清を使用した誘発採痰方法
NCT03391778	遺伝子　GSK3377794（NY-ESO-1á¶œÃ²ãµã³ T）
NCT02133196	薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：YOUNG　TIL
NCT03397186	処置：生検|その他：検査室バイオマーカー分析|薬物：トラベクテジン
NCT03849651	薬物：シクロホスファミド|生物学的：フルダラビン|薬物：チオテパ|薬物：メルファラン|生物学的：G-csf|薬物：メスナ|デバイス：CliniMACS|生物学的：ATG（ウサギ）|薬物：プリナツモマブ|生物学的：TCRβ±/β+|生物学的：CD19+|生物学的：CD45RA 枯渇 DLI
NCT03953599	生物学的：CD19-STAR-T 細胞
NCT00924326	薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド|生物学的：抗分化抗原群 19（CD19）-CAR　PBL|薬物：アルデスロイキン
NCT02719405	栄養補助食品：Lactobacillus　GG|栄養補助食品：広範囲に加水分解されたカゼイン配合物|栄養補助食品：アミノ酸配合物
NCT03118687	その他：生体標本及びサーベイ収集
NCT01454596	生物学的：上皮成長因子受容体（ＤＧＦＲｖ）ＩＩＩキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）形質導入ＰＢＬ|薬物：アルデスロイキン|薬物：フルダラビン|薬物：シクロホスファミド
NCT01209676	薬物：IMCgp100 注射
NCT03568058	医薬品：パーゾナライズ化ワクチン|薬物：ペンブロリズマブ
NCT03551795	生物学的：ｉNKT 細胞の注入
NCT01723306	遺伝子的：遺伝子改変Ｔ細胞
NCT02570308	薬物：　IMCgp100
NCT02776813	生物学的：ACTR087|生物学的：リツキシマブ
NCT04713163	薬物：covid19 ワクチン
NCT03267641	
NCT02135406	生物学的：CART-19　Ｔ細胞
NCT02546167	生物学的：CART-BCMA
NCT02030834	生物学的：CART-19
NCT02711696	行動：GCED、グルテン摂入除去ダイエット
NCT03093688	生物学的：INKT 細胞及び CD8+T 細胞の注入
NCT02681302	薬物：イピリムマブ|薬物：ニボルマブ
NCT02840110	その他：ACTR　Ｔ細胞生成物
NCT00622232	遺伝子的：VRX496_形質導入した自己 CD4　T 細胞
NCT03921047	処置：生体標本収集|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT02333760	遺伝子的：WASP レンチウイルスベクターで形質導入した自己 CD34+細胞
NCT03515551	薬物：IMCsyeso
NCT01921036	処置：従来の心臓リハビリテーション|処置：複合運動
NCT04556474	

【図２０Ｉ】

NCT番号	介入
NCT00004178	生物学的：治療用自己リンパ球
NCT04783038	その他：遺隔レイキ|その他：偽遠隔レイキ
NCT02661659	生物学的：マルチペプチドワクチン S-588210
NCT01211262	薬物：　IMCgp100
NCT01036399	薬物：レナリドマイド
NCT04790409	薬物：ＰＤ－１阻害剤及びアンロチニブ
NCT02244450	生物学的：SCID スクリーニング
NCT03559803	薬物：シスプラチン
NCT02702427	生物学的：ウイルス特異的Ｔ細胞
NCT01884168	生物学的：DC-CIK 免疫療法
NCT02941744	薬物：ニボルマブ|薬物：イピリムマブ
NCT00019136	生物学的：MOv-ダンマキメラ受容体遺伝子|生物学的：アルデスロイキン|生物学的：治療用同種異系リンパ球
NCT02472704	栄養補助食品：グルテン負荷|栄養補助食品：プラセボ負荷
NCT03541083	薬物：プリナツモマブ
NCT01050296	
NCT04411043	行動：分子カラクタライゼーション（Molecularcaracterization）
NCT00341146	
NCT03709719	薬物：プリナツモマブ注射
NCT04729452	血：血液検査
NCT02980146	その他：非介入試験
NCT03166878	生物学的：UCART019
NCT03038334	栄養補助食品：硫酸マグネシウム
NCT03644043	デバイス：EEG スキャン
NCT03038282	栄養補助食品：塩化クロム|その他：個々の運動
NCT00172666	
NCT02889861	薬物：　MCgp100
NCT02102893	
NCT03209245	生物学的：PurethalMites|その他：プラセボ注射|診断検査：アレルゲン特異的 IgE のモニタリング|診断検査：アレルゲン特異的 IgG4 のモニタリング
NCT01384201	
NCT03523429	薬物：プリナツモマブ
NCT00396695	処置：血液検査
NCT04908514	薬物：　ADX-629
NCT02590328	
NCT00924287	薬物：インビトロ腫瘍反応性、キメラＴ細胞受容体（ＣＡＲ）遺伝子導入ＰＢＬ＋ＩＶアルデスロイキン|薬物：シクロホスファミド|薬物：フルダラビン|薬物：メスナ

【図２０Ｊ】

NCT番号	介入
NCT03088904	生物学的：FluMistÂ（登録商標）四価|生物学的：FluzoneÂ（登録商標）四価ワクチン
NCT04262466	薬物： IMC-F106C|薬物：抗 PD(L)1
NCT01231841	薬物：シクロスポリン|生物学的：抗胸腺細胞グロブリン
NCT01207388	薬物：プリナツモマブ
NCT04622423	その他：観察研究
NCT04034225	薬物： SNS-301|薬物：ペンブロリズマブ
NCT01020396	薬物：メトロニダゾール
NCT01906632	生物学的：CD-CIK 免疫療法
NCT03325465	薬物：ペンブロリズマブ|薬物：エパカドスタット
NCT00894842	薬物：プレグネノロン|薬物：プラセボ
NCT04337515	デバイス：CliniMacsÂ（登録商標）
NCT03397355	
NCT03070392	生物学的：IMCgp100|薬物：ダカルバジン|生物学的：イピリムマブ|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04206943	生物学的：CAR-T 細胞療法
NCT04406272	薬物：VB11|処置：手術|その他：プラセボ|薬物：ペバシズマブ
NCT04691713	薬物：ＣＤ２７６自己キメラ抗原受容体Ｔ細胞を標的とする
NCT04691349	薬物： CAR-T
NCT03132922	遺伝子的：自己遺伝子改変 MAGE -A4á¶ceÂ¹Â®Â³Â²T 細胞|放射線：低線量放射線と組み合わせた自己遺伝子改変 MAGE-A4c1032T 細胞
NCT02370212	栄養補助食品：クレアチン|栄養補助食品：プラセボ|その他：高強度インターバルトレーニング
NCT04405154	生物学的：カムレリズマブ|薬物：シスプラチン|放射線：IMRT 又は VMAT
NCT00871481	生物学的：イピリムマブ|薬物：シクロホスファミド|処置：生検|生物学的：アルデスロイキン|その他：免疫組織化学染色法|遺伝子的：ポリメラーゼ連鎖反応|その他：免疫酵素技法|生物学的：治療用細胞傷害性Ｔリンパ球
NCT01077531	薬物：オテリキシズマブ|薬物：該当するプラセボ
NCT03619551	薬物：プスルファン|デバイス：TCRÎ±Î²/CD19+拡張のための細胞処理
NCT04844489	その他：SARS-CoV-2 バリアントに対する体液性応答及び COVID-19 に対するワクチン接種後の細胞応答の試験のための血液試料
NCT01863888	薬物：テリフルノミド HMR1726|薬物：コレステラミン|薬物：チャコール
NCT01430390	生物学的：生物学的/遺伝子改変Ｔ細胞|薬物：シクロホスファミドベースの化学療法
NCT03335605	
NCT03340155	その他：光（化学）療法
NCT04523376	薬物：CliniMACS
NCT00113464	
NCT04913519	薬物： TDM-105795|薬物：プラセボ
NCT01355965	生物学的：自己Ｔ細胞
NCT02319226	その他：HLA 同一同胞|ドナーからの移植

【図２０Ｋ】

NCT番号	介入
NCT01440413	生物学的：血液及び腫瘍試料
NCT01175239	遺伝子的：自己不活性化（ＳＩＮ）ガンマレトロウイルスベクターｐＳＲＳ１１．ＥＦＳ．ＩＬ２ＲＧ．ｐｒｅで形質導入した自己ＣＤ３４＋細胞の単回注入
NCT03973333	薬物： IMC-C103C|薬物：アテゾリズマブ
NCT02028819	薬物：ドルテグラビルナトリウム一水和物|薬物：イバリズマブ
NCT04195932	その他：エクササイズトレーニング
NCT00560794	生物学的：プリナツモマブ(MT103)
NCT04326751	
NCT00845416	
NCT03587285	生物学的：Ｔｃｍ+酢酸ゴセレリン+ビカルタミド|生物学的：Ｔｃｍ+酢酸ゴセレリン+酢酸アビラテロン
NCT01174875	
NCT04727151	生物学的：TAC01-HER2
NCT03407170	生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04864379	生物学的：iNeo-Vac-P01|その他：GM-CSF|薬物：PD-1|処置：RFA
NCT03880279	生物学的：TAC01-CD19
NCT04134325	生物学的：ニボルマブ|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT04354038	
NCT03697824	薬物： GSK3377794|薬物：ペンブロリズマブ|薬物：フルダラミン|薬物：シクロホスファミド
NCT02799901	生物学的：ニボルマブ|放射線：低分割放射線療法
NCT00545493	薬物：タクロリムス|薬物：ｉ．ｖ．免疫グロブリン
NCT03802955	薬物： ADG106
NCT00694551	生物学的：ペプチドワクチン|薬物：ポリＩＣ－ＬＣ
NCT03707093	薬物： ADG106
NCT04145232	生物学的：生検（FFPE）、血液（PBMC）、及び便の収集
NCT03878589	薬物：オキシトシン（OT）|薬物：プラセボ(P)
NCT00785967	生物学的：各種ワクチン
NCT04397900	
NCT02706392	その他：検査室バイオマーカー分析|生物学：ROR1　CAR 特異的自己Ｔリンパ球
NCT03904069	薬物： AMG 553
NCT02210741	
NCT04362293	薬物：ヒドロキシ尿素、アザチオプリン、アレムツズマブ、チオプテパ（thioptepa）、低用量全身照射、及びシロリムス|薬物：ヒドロキシ尿素、アザチオプリン、アレムツズマブ、チオテパ、プレリキサフォル、低用量全身照射、シクロホスファミド、及びシロリムス
NCT01260532	
NCT00001688	薬物：リトナビル|薬物：ネビラピン|薬物：スタブジン
NCT04340401	薬物： SHR-1210|薬物：オキサリプラチン|薬物：カペシタビン|放射線：強度変調放射線療法|処置：全直腸間膜切除術
NCT00081783	薬物：Xcellerated　Ｔ細胞
NCT00327496	生物学的：DC ワクチン

【図２０Ｌ】

NCT番号	介入
NCT01410019	その他：遺伝子移入
NCT04065776	放射線：海馬回避プロトン療法
NCT00678886	生物学的：オテリキシズマブ注入＋医師決定した標準ケア|生物学的：プラセボ注入＋医師決定した標準ケア
NCT04422314	診断検査：T-Detect　Lyme
NCT04482699	生物学的：COVID-19 の RAPA-501-Allo 既製療法|その他：プラセボ
NCT04207320	Miltenyi　ClinIMACS システムによるデバイス Î±Î²+T 細胞枯渇
NCT02219165	薬物：静脈内ヒト免疫グロブリン|薬物：アルブミン
NCT02466217	その他：1: AID 群|その他：2: 対照群
NCT02889016	
NCT00342134	処置：幹細胞移植
NCT01982487	生物学的：ALVAC（2）/NY-ESO-1（M）/TRICOM ワクチン|薬物：IDO1 阻害剤 INCB024360|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：薬理学的試験
NCT02166905	生物学的：DEC-205/NY-ESO-1 融合タンパク質 CDX-1401|薬物：エパカドスタット|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：薬理学的試験|薬物：ポリＩＣＬＣ
NCT02535078	薬物： IMCgp100|薬物：デュルバルマブ|薬物：トレメリムマブ
NCT04658303	その他：ピモニダゾール
NCT00001941	生物学的：ダクリズマブ
NCT02618109	生物学的：血液試料の収集
NCT03948763	生物学的：V941|生物学的：ペンブロリズマブ
NCT02761122	処置：ヒト生体試料
NCT01744223	生物学的：BPX-501 用量 1|薬物：リミデュシ|生物学的：ＢＰＸ－５０１用量 2|生物学的：BPX-501 用量 3|生物学的：BPX-501 用量 4|処置：SCT
NCT00839436	薬物： CYT107
NCT04451980	処置：皮下脂肪組織生検|放射線：CT スキャン|診断検査：経口グルコース耐性検査|診断検査：血液収集
NCT04369963	処置：生検を伴う食道胃十二指腸内視鏡検査及び結腸内視鏡検査
NCT00924001	薬物：DMF5 メラノーマ反応性 TIL|薬物：シクロホスファミ|薬物：フルダラビン|薬物：アルデスロイキン
NCT03578185	
NCT01883804	薬物：メチルドパ
NCT04697940	生物学的：デシタビン-プライム化タンデム CAR19/20 操作したＴ細胞
NCT00213629	その他：トランスクリプトーム分析|その他：Ｂ細胞レパートリー分析
NCT01192464	薬物：自己 CAR.CD30　EBV 特異的 CTL
NCT00597441	生物学的：ＵＣＢ移植のレシピエントのための胸腺移植
NCT01413022	薬物：オキサリプラチン|薬物：イリノテカン|薬物：ロイコボリン|薬物：フルオロウラシル|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：フローサイトメトリー|その他：免疫組織化学染色法|その他：薬理学的試験|薬物：PF-04136309
NCT03680560	生物学的：ACTR　Ｔ細胞生成物|薬物：トラスツズマブ

【図２０Ｍ】

NCT番号	介入
NCT01114503	薬物：オテリキシズマブ-低用量|薬物：オテリキシズマブ-中低用量|薬物：オテリキシズマブ-中高用量|薬物：オテリキシズマブ-高用量|薬物：オテリキシズマブ|薬物：メチルプレドニゾロン
NCT04549142	その他：介入なし
NCT00324623	生物学的：Melan-A　VLP ワクチン、IMP321 アジュバント|生物学的：養子免疫療法|生物学的：治療用自己リンパ球|薬物：シクロホスファミ|薬物：リン酸フルダラビン
NCT04354584	
NCT00379119	その他：診断検査室バイオマーカー分析|その他：フローサイトメトリー|その他：生理学的検査|処置：コンピュータ断層撮影
NCT00471887	生物学的：CP-675,206
NCT03795610	薬物： IPI-549
NCT04903795	薬物：hEGFRvIII-CD3（BRiTE）|生物学的：活性化細胞療法
NCT03396575	生物学的：GM-CSF を有する TTRNA-DC ワクチン|生物学的：TTRNA-αALT|薬物：シクロホスファミド+フルダラビンリンパ枯渇コンディショニング|薬物：用量増強 TMZ|薬物：Td ワクチン|生物学的：自己造血幹細胞（HSC）
NCT03129061	薬物：[18F]　ＦｰＡｒａＧ　ＰＥＴスキャン、ベースライン＋抗ＰＤ－１療法
NCT00520130	生物学的：リツキシマブ|薬物：シクロスポリン|薬物：同種異系幹細胞移植（ASCT）|薬物：コンディショニング化学療法|薬物：TMS|薬物：FLAG|薬物：EPOCH-F|生物学的：アレムツズマブ
NCT04445844	生物学的：Pelareorep|その他：生活の質の評価|その他：アンケート管理|生物学的：レチファンリマブ
NCT02846376	薬物：ニボルマブ|薬物：イピリムマブ
NCT03159845	薬物：硫酸亜鉛経口製品|薬物：レボフロキサシン 500Mg 経口錠剤|薬物：フルコナゾール 200mg タブ|薬物：アシクロビル 400MG
NCT04792437	処置：手術
NCT01911065	生物学的：ゾスタバシ ã¸c
NCT01583972	栄養補助食品：パルミチン酸レチニル|栄養補助食品：プラセボ
NCT04224558	薬物：メスナ|薬物：シクロホスファミド|薬物：フィルグラスチム|処置：アフェレーシスカテーテル留置|処置：白血球アフェレーシス|薬物：メチルプレドニゾロン|薬物：ジフェンヒドラミン|薬物：アセトアミノフェン|薬剤：抗胸腺細胞グロブリン（ウサギ）|薬剤：リンパ球免疫グロブリン|生物学的：末梢血幹細胞注入|薬物：シトキサン
NCT00439465	生物学的：エクスビボ拡張したエフェクター細胞
NCT04626440	処置：診断段階又は臨床転帰
NCT03877250	診断検査：治療前生検|診断検査：治療中生検|診断検査：疾患進行時の生検|診断検査：末梢血液ベースの試験
NCT03601286	薬物：レンチウイルスベクター形質導入ＣＤ３４＋細胞
NCT00621452	生物学的：治療用自己リンパ球|薬物：シクロホスファミ|生物学的：アルデスロイキン|遺伝子的：ポリメラーゼ連鎖反応|遺伝子的：遺伝子再配列分析|処置：リンパ節生検|生物学的：遺伝子操作したリンパ球療法|処置：骨髄吸引|その他：フローサイトメトリー|その他：検査室バイオマーカー分析|その他：酵素結合免疫吸着アッセイ
NCT04708535	
NCT01670994	生物学的：ALT-801
NCT01625260	生物学的：ALT-801|薬物：ゲムシタビン
NCT02055196	生物学的：カルボキシルエステラーゼ発現性同種異系神経幹細胞|薬物：イリノテカン塩酸塩|その他：検査室バイオマーカー分析
NCT01326871	薬物：シスプラチン|薬物：ゲムシタビン|生物学的：ALT-801

【図２０Ｎ】

NCT番号	介入
NCT00361101	薬物：AMD11070
NCT03827967	生物学的：PulsVU-DC
NCT03784014	実物：ニューヨーラン薬物：セリナーラ薬物：カテーテラ薬物：ラパーラ薬物：トラメチニブ及びダブラフェニブ併用製品：トラメチニブ及びダブラフェニブ併用製品：オラパリブ及びゲムシタビン薬物：ペグインターフェロンアルファ2a薬物：ペグインターフェロンアルファ2b薬物：ペグインターフェロンアルファ薬物：ラスクテシド薬物：TAS-120その他：表皮成長因子阻害剤 エクソーム
NCT01607216	
NCT01343043	生物学的：NY-ESO-1/cG7原T細胞
NCT01066377	医薬補助食品：プレバイオティクス及びプロバイオティクスの摂
NCT03967223	薬剤：レナトスタンアクトルーセル(tisa-cel;GSK3377794)薬剤：フルダラビン薬物：シクロホスファミド
NCT02989064	遺伝子的：自己遺伝子改変 MAGE A10d1*fcsΔ3d1s1*T細胞
NCT02592577	生物学的：自己遺伝子改変 MAGE A10d1*fcsΔ3d1s1*T細胞
NCT02876510	薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド 生物学的：IMA101 作成物の生物学的：細胞および インターロイキン-2 診断検査：IMADetect薬物：アテゾリズマブ
NCT03260712	薬物：ペンブロリズマブ薬物：シスプラチン薬物：ダムシクビン
NCT03738800	薬物：CD27mAb クローン 2G6Lc 変異体 薬物：CD27mAb クローンビセルカ
NCT02862021	薬物：SG001 の開始：SG001-3薬物：SG001-4
NCT02630901	細胞：PRX003 生その他：プラセボ
NCT00816413	薬物：シクロホスファミド薬物：ミラプレックス薬物：ペントスタチン[薬品千的：細胞遺伝学的分析遺伝子的：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション[遺伝子的：タンパク質分析その他：フローサイトメトリー生その他：免疫酵素技術その他：検査室バイオマーカー分析その他：低強度移植コンディショニング処置状況：非骨髄破壊的同種異系造血幹細胞移植の状況：未照射造血幹細胞移植（PBSC）設計者：生産物好
NCT03139981	薬物：ASN002 薬物：プラセボ様白血病
NCT03349060	薬物：PF-04965842 100 mg 薬物：PF-04965842 200 mg 薬物：プラセボ
NCT03259620	薬物：CLS006 薬物：CLS006 ビセル
NCT03721172	薬物：アプレミラスト生その他：プラセボ
NCT02611804	実物：ジクロフェナクナトリウム薬物：プラセボ
NCT02303821	薬物：カルフィルゾミブ薬物：デキサメタゾン薬物：ミトキサントロン薬物：PEG-アスパラギナーゼ薬物：ビンクリスチン薬物：髄腔内 (IT) メトトレキサート薬物：髄腔内トリプル薬品（髄腔内メトトレキサート、及びメトトレキサート）薬物：6-メルカプトプリン薬物：シクロホスファミド薬物：シタラビン薬物：ダウノルビシン
NCT03443024	生物学的：レブリミズマブ薬物：プラセボ
NCT02780167	薬物：PF-04965842 薬物：プラセボ
NCT03127956	薬物：オベシコスタットテトラヒドロジェル、3.0% 薬物：オベシコスタットテトラヒドロジェル、5.0%その他：オベシコスタットテトラヒドロジェル ビセル
NCT03073486	薬物：オベシコスタットテトラヒドロジェル、3.0%その他：オベシコスタットテトラヒドロジェル ビセル
NCT04015700	生物学的：Gencos Therapeutics によって開始されたハーシプライド化水素抗体 DNA ワクチン(デバイス：Gencos Therapeutics によって作成された CELLECTRA® (筋肉内適用) 2000PP デバイス)薬物：IL-12 をコードするプラスミド
NCT02640625	医薬補助食品：プロバイオティクス化合物

【図２０Ｏ】

NCT番号	介入
NCT02864082	薬物：PAT-001, 0.1% 薬物：PAT-001, 0.2% 薬物：ビセル
NCT02682238	薬物：BBI-4000, 15% 生その他：ビセルジェル
NCT01368107	薬物：プラセボ薬物：インターロイキン7
NCT03978624	薬物：ペンブロリズマブ薬物：ニンテダニブ エタノラート
NCT03233155	薬物：ニボルマブ薬物：イピリムマブ投与後：治療後肺癌
NCT00451321	薬物：オテリキシズマブ
NCT02010203	生物学的：BS-410 生物学的：プラセボ非生物学的：BCG
NCT01460160	薬物：ダサチニブ
NCT03953794	デバイス：Fitbit Charge 3
NCT01280955	薬物：デレリキセブル
NCT03341143	薬物：ペムブロリズマブ女性う 薬物機能生物静脈
NCT04373200	生物学的：血液試料収集とその他：感染症検
NCT01536054	生物学的：ALVAC(2)-NY-ESO-1(M)/TRICOM ワクチン薬剤：シロリムスその他：検査室バイオマーカー分析生物学的：サルグラモスチム
NCT03618641	薬物：CMP-001 生物学的：ニボルマブ
NCT03031990	生物学的：アルデスロイキン生物学的：ペバシズマブ
NCT03249870	薬物：イノツズマブオゾガイシン (INO)
NCT04714983	生物学的：DNK-340
NCT04495894	薬物：術前トロプラック
NCT03167151	薬物：ペンブロリズマブ
NCT04102150	薬物：パレントスタットトシル酸塩
NCT04196491	生物学的：hN2L1 カルフィルゾミブ薬物：フルダラビン薬物：シクロホスファミド薬物：レナリドマイド
NCT03927898	薬物：トリパリマブ投与後：造血幹細胞移植
NCT04765462	生物学的：同種異系 T 細胞
NCT04553393	薬物：ダダミ 医薬物：デシタビン薬物：ヂダミ 医ぴデシタビン生物学的：デシタビンプライム化テンダム CAR19/20 操作した T 細胞
NCT03971214	薬物：PD-1 阻害剤 JS-001
NCT02116270	生物学的：血液試料
NCT04286815	デバイス：レンチウイルスベクター遺伝子療法
NCT04330118	
NCT04394884	
NCT04888611	生物学的：ガムレリズマブGSC-DCC生物学的：ガムレリズマブプラセボ
NCT01488552	薬物：グムシクビン薬物：nab-パクリタキセル薬物：FOLFIRINOX遺伝子的：免疫組織化学 (IHC) 分析薬物：メトトレキサート薬物：MFOLFIRI
NCT02741323	薬物：ヤクビセル薬物：プラセボ
NCT02014506	薬剤：フルダラビン薬物：シクロホスファミド 医薬学的：抗胸腺細胞グロブリン生物学的：フルオダラスチム放射線：全身放射線照射応答：TCR/CD3 抗細胞移植デバイス：CliniMACS
NCT04133948	薬物：トマゼタスト薬物：ニボルマブ薬物：イピリムマブ
NCT03312244	薬物：表皮ヒト下大ダラダン薬物：プラセボ

【図２０Ｐ】

NCT番号	介入
NCT03449108	生物学的：アルデスロイキン医療学的：自己腫瘍溶解性ヒンバ様 LN-145 薬物：自己腫瘍浸潤性リンパ球 LN-145-S1 薬物：シクロホスファミド薬物：フルダラビン その他：生活の質の評価その他：アンケート管理
NCT03969446	薬物：デンタビン生物学的：ペンブロリズマブ
NCT02716233	薬物：ベクアスパラガーゼ 12500IU/m2 薬物：ベクアスパラガーゼ 2500IU/m2×1
NCT04419467	生物学的：CSL346 薬物：プラセボ
NCT03921021	薬物：テロスメリシン
NCT03361809	薬物：エンチナスタット
NCT02965716	生物学的：ペンブロリズマブ医療学的：タリモジンラベルパスカ
NCT04911621	生物学的：癌抗原由来ペプチド薬物：ペモチニムミド ベースの化学療法剤その他：癌抗原由来ワクチン 医薬：癌の第二選択治療
NCT04930055	生物学的：COVID-19 ワクチン治療
NCT01712945	薬物：パリフェルミン薬物：アレムツズマブ
NCT00521339	薬物：アプレミラスト
NCT00217763	薬物：3APS
NCT03357757	薬物：パルプロ酸生物学的：アベルマブ
NCT03082534	薬剤：ペンブロリズマブ、セクキヌマブ
NCT04858607	診断検査：血液試料診断検査：循環試料
NCT03615105	放射線：最初治療前全身放射線照射薬剤：チオテパ薬物：シクロホスファミド医薬：プルスファノ薬物：フルダラビン薬物：メルファラン薬物：クロファラビン処置：HPC (A) 幹細胞回収系移植薬物：リツキシンプデバイス：ウサギ胚胸腺細胞グロブリン
NCT01757639	生物学的：イピリムマブその他：検査室バイオマーカー分析
NCT00852618	
NCT02963610	薬物：レナリドマイド医薬：ペンブロリズマブ
NCT02027610	
NCT03601455	生物学的：デュルバルマブ放射線：外部ビーム放射線療法治療学的：トレメリムマブ
NCT03634332	薬物：PEGPH20 医療学的：ペンブロリズマブ
NCT02536794	生物学的：抗 BTN1 モノクローナル抗体 ASTX034 その他：検査室バイオマーカー分析その他：臨床学的評価療法学的：トレメリムマブ
NCT01579318	生物学的：タボキノダンテセアクスミド (TAVO) デバイス：OmniSec X ディカルシステム (OMS)
NCT02978625	その他：検査室バイオマーカー分析治療学：ニボルマブ生物学的：タリモジンラベルパスカ
NCT04301076	薬物：シクロホスファミド医療：トラバピン塩酸塩薬物：エトポシド医療：レナリドマイド薬物：プレドニゾン薬物：硫酸ビンクリスチン
NCT02860559	生物学的：TRX-1400
NCT02981914	薬物：ペンブロリズマブ
NCT02215707	生物学的：PEG20 ワクチン
NCT03852823	薬物：SG001
NCT04300244	生物学的：UV1 ワクチンイピリムマブ生物学的：イピリムマブ生物学的：ニボルマブ
NCT03812549	薬物：シンテジリブ放射線：定位放射線療法放射線：低線量放射線療法
NCT04120454	生物学的：ペンブロリズマブ生物学的：ラムシルマブ

【図２０Ｒ】

NCT番号	介入
NCT03526185	薬物：膵腺房細胞リンパ腫薬剤：ニボルマブ及びイピリムマブ
NCT04630353	薬物： HB-201 IT
NCT01479296	生物学的：VRC rAd5 ワクチン（rAd5 gag-pol/nev A/B/C）生物学：rAd5 env A/E生物学：rAd5 env C/E生物学：rAd5 gag-pol生物学：プラセボワクチン
NCT03007147	処置：頭痛表活血幹線経幹経脳薬物：シクロホスファミド薬物：シクラビン薬物：ダウノルビシン塩酸塩薬物：デキサメタゾン薬物：デスラゾキサン塩酸塩薬物：ドキソルビシン薬物：エトポシド生物学的：ファルグラスチム薬物：イホスファミド薬物：メシル酸イマチニブその他：検査室バイオマーカー分析薬物：ロイオポリシルビル薬物：メルカプトプリン薬物：エトポシド生物学：薬物：メチルプレドニゾロン薬物：ベバシズルバガー薬物：プレドニゾロンその他：アンケート管理薬物：治験用ヒトコルチゾン薬剤：リオアニン薬物：組織ビンクリスチン
NCT03389802	生物学的：再発又は難治性の原発性脳所の原発性脳腫 CNS 腫瘍患者のための APX005M 信頼性物学的：新たに診断された DIPG 患者のための APX005M 治療
NCT02129075	生物学的：DEC-205/NY-ESO-1 融合ワクチン質 CDX-1401その他：検査室バイオマーカー分析生物学：未才抗原パースのメラノーマ-ポリ ICLC ワクチンその他：薬遺学的試験生物学的：組織去 IND リガンド F
NCT03220022	薬物：シクロホスファミド薬物：ドキソルビシン塩酸塩薬物：エトポシド生物学的：ファルグラスチム薬物：イプルグラスチム薬物：イプルダコプその他：検査室バイオマーカー分析生物学：ペクフィルグラスチムその他：薬遺学的試験薬物：プレドニゾン生物学的：リリキシマブ薬物：組織ビンクリスチン
NCT01976182	薬物：メトトレキサート薬物：シクロホスファミド
NCT03083158	薬物：B 型肝炎ワクチン
NCT00086359	薬物：経鼻アバスピル、ラミブジン、ジドブジン薬物：ラミブジン/ジドブジン薬物：ロピナビル/リトナビル
NCT03475134	その他：TIL薬物：シクロホスファミド薬物：フルダラビン薬物：インターロイキン-2 薬物：ニボルマブ
NCT04659486	行動：在宅ニクササイズトレーニング
NCT02869295	薬物： NKTR-214
NCT04810910	生物学的：Neo-Vac-P01その他：GM-CSF
NCT03662815	生物学的：Neo-Vac-P01その他：GM-CSF
NCT03645148	生物学的：Neo-Vac-P01その他：GM-CSF
NCT02775851	生物学的：ペムブロリズマブ他薬：治療的従来手術
NCT04193189	生物学的：HEPLISAV-B(生物学的)：ENGERIX-B
NCT03739996	薬物：経口カボザンチニブ（CAB）薬物：ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NRTI）薬物：長時間作用型注射用カボザンチニブ（CAB LA）生物学的：VRC07-523LS薬物：標準ケア（SOC）第口 ART
NCT03705169	生物学的：SARS441236に生物学的：プラセボ薬物：抗レトロウイルス治療
NCT03635788	薬物：標準ケア（SOC）第口 ART薬物：経口 RPV薬物：経口 CAB薬物：RPV－LA 皮下用長薬物 CAB－LA 皮下用長薬物：RPV－LA 単剤用長薬剤：CAB－LA 単剤用長薬剤
NCT03560258	生物学的：pLNCE12 pDNA ワクチン生物学的：余反 pSF'gag pDNA ワクチン混合した pLNCE12 pDNA ワクチン生物学的：余反 pSF'gag pDNA ワクチン生物学的：プラセボ
NCT03003676	生物学的：ONCOS-102薬物：シクロホスファミド薬物：ペンブロリズマブ
NCT04375527	薬物：ヒニメダニブ生物学的：ニボルマブその他：アンケート管理
NCT03123055	薬物： B-701 薬物：ペンブロリズマブ
NCT02344290	薬物：ビタバスタチン薬物：プラセボ

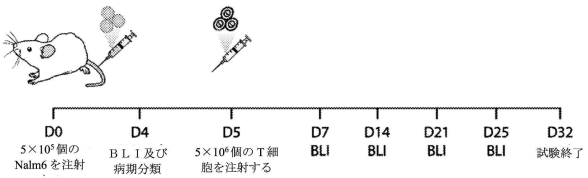
【図２０Ｓ】

NCT番号	介入
NCT01949116	薬物：LDMTX薬物：プラセボ併薬補助食品：薬物
NCT01266616	生物学的：Protecus HIV MAG pDNA ワクチン生物学的：IL-12その他：プラセボ
NCT01482767	薬物：ペグ化インターフェロンアルファ 2b（PEG-IFN）薬物：リバビリン（RBV）薬物：ボセプレビル（BOC）
NCT00660972	薬物：ラルテグラビル薬物：エムトリシタビン/テノホビルジソプロキシルフマル酸塩
NCT00537394	薬物：エンシビルチド薬物：ラルテグラビル薬物：ダルナビル薬物：ザブタナビル薬物：エトラビリン薬物：マラビロク
NCT04212416	薬物：レクルノミド
NCT00082486	薬物：SCH-HCVビクリビロク薬剤：プラセボ
NCT02788916	その他：介入なし
NCT03836690	生物学的：CD62L-Tem
NCT03318562	薬物： eFT508
NCT04068194	薬物：アベルマブ放射線：低分割放射線療法薬物：ペボセルチブ
NCT01209286	生物学的：プリナツモマブ
NCT03206047	薬物：アテゾリズマブ生物学的：DEC-205/NY-ESO-1 融合タンパク質 CDX-1401薬物：グアデシタビンその他：検査室バイオマーカー分析薬物：ポリ ICLC
NCT03854032	生物学的：ニボルマブ生物学的：IDO1 阻害剤 BMS-986205処置：治療的従来手術その他：アンケート管理
NCT04214249	薬物：シタラビン薬物：グラムルビシン塩酸塩処置：造血細胞移植薬物：イダルビシン塩酸塩生物学的：ペンブロリズマブ
NCT03258554	生物学的：セツキシマブ生物学的：デュルバルマブ放射線：抽出室腫瘍放射線療法その他：検査室バイオマーカー分析その他：生活の質の評価その他：アンケート管理
NCT02027805	生物学的：T-Guard
NCT03065023	薬物：：MK-4621
NCT04387071	生物学的：アナニスト佐 OX40 モノクローナル抗体 INCAGN01949薬物：VLP カプセル化 TLR9 アゴニスト CMP-001
NCT03055013	処置：従来の手術生物学的：ニボルマブその他：患者属統その他：生活の質の評価その他：アンケート管理
NCT04254419	生物学的：NK 細胞
NCT02985554	薬物：ニボルマブ
NCT03600155	生物学的：イピリムマブ生物学的：ニボルマブ
NCT03578575	薬物：Danggui Buxue Tang薬物：プラセボ
NCT04130763	生物学的：tMT カプセル
NCT03566488	生物学的：鼻粘膜採甲状腺腺腫
NCT02960332	薬物：ペンブロリズマブ薬物：レナリドマイド薬物：デキサメタゾン
NCT04215146	薬物：メタリタキセル生物学的：パクレオシタブ薬物：アベルマブ
NCT03610490	生物学的：自己腫瘍浸潤性リンパ球 MDA-TIL薬物：シクロホスファミド薬物：フルダラビン生物学的：インターロイキン2その他：生活の質の評価
NCT03007238	生物学的：アルデスロイキン処置：化外傷腫瘍広汎化学療法その他：検査室バイオマーカー分析その他：生活の質の評価
NCT03605238	生物学的：コルチコステロイド不 dmCART1020
NCT03277209	薬物：アレリキサフォル

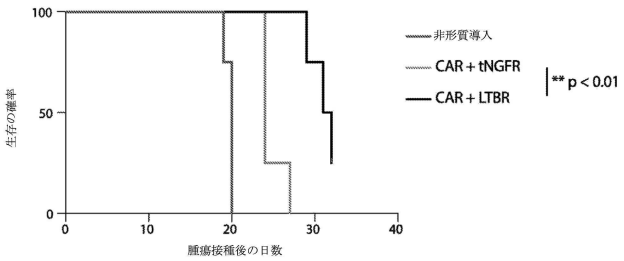
【図２０Ｔ】

NCT番号	介入
NCT02924038	生物学的：INAS00(生物学的：ポリ ICLC(生物学的)：パリペマブ
NCT02399371	生物学的：：ペンブロリズマブその他：検査室バイオマーカー分析その他：薬遺ダノム試験
NCT04260529	薬物： CyPep-1
NCT03506997	薬物：ペンブロリズマブ
NCT04360941	薬物：パルボシクリブ薬物：アベルマブ
NCT02453620	薬物：エンシタスタット生物学的：イピリムマブ生物学的：ニボルマブその他：薬遺ダノム試験その他：薬遺学的試験
NCT04459078	薬物：ホルトリズマブ薬物：アルブミンパクリタキセル薬物：アザシタビン
NCT03914300	薬物：カボザンチニブ-S-リンゴ酸塩生物学的：イピリムマブ生物学的：ニボルマブ
NCT02950259	薬物：シクロホスファミド薬物：インドメタシン薬物：オメプラゾール保薬補助食品：マルチビタミン
NCT02405221	生物学的：TA-CIN（脂）生物学的：TA-CIN（大腸）
NCT03430687	その他：検査室バイオマーカー分析生物学：タリモジンラールレプベク
NCT04091867	薬物：化学療法を伴う 4faphA4IAS薬物：セツキシマブ放射線：放射線療法
NCT04926948	その他：免疫検法その他：生活の質の評価放射線：遺伝放射線療法
NCT04284787	薬物：アザシチジン生物学的：ペンブロリズマブ薬物：ペネトクラクス
NCT03653052	薬物：デュルバルマブ
NCT03538899	薬物：APmAntiPアバイス；ClinMACSA（幹細胞療）CD34 試薬システムセルソーターデバイス薬剤：プルルケタン
NCT03383302	放射線：遊位放射線療法薬物：ニボルマブ
NCT03385226	薬物：遊位放射線療法薬物：ニボルマブ
NCT04577807	生物学的：PVSRIPO(生物学的)：抗 PD－1 チェックポイント阻害剤

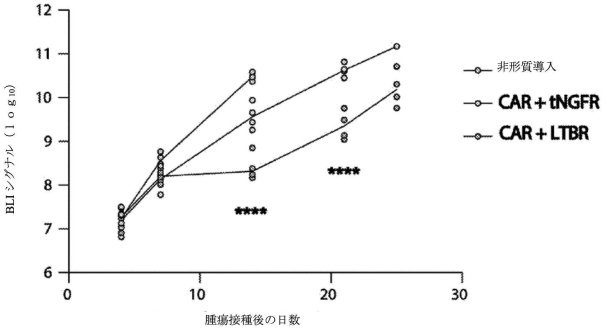
【図２２Ａ】



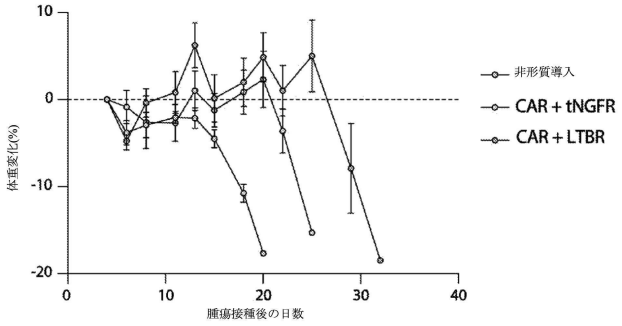
【図２２Ｂ】



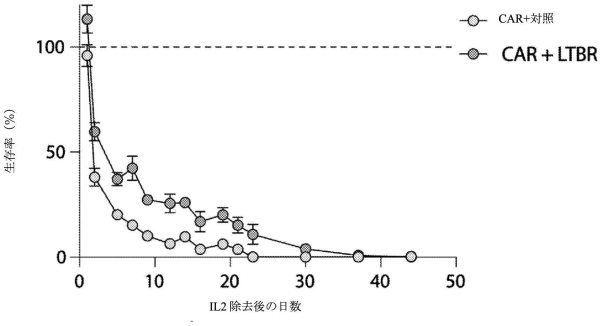
【図２２Ｃ】



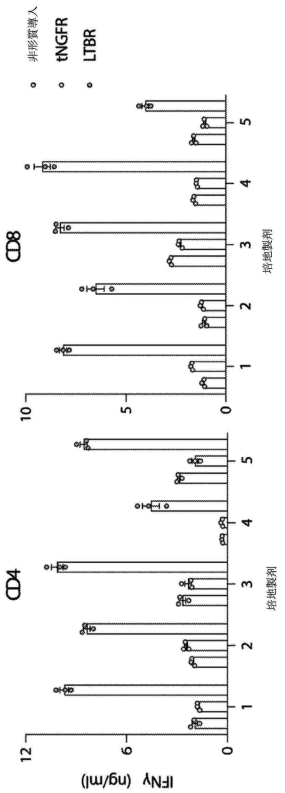
【図２２Ｄ】



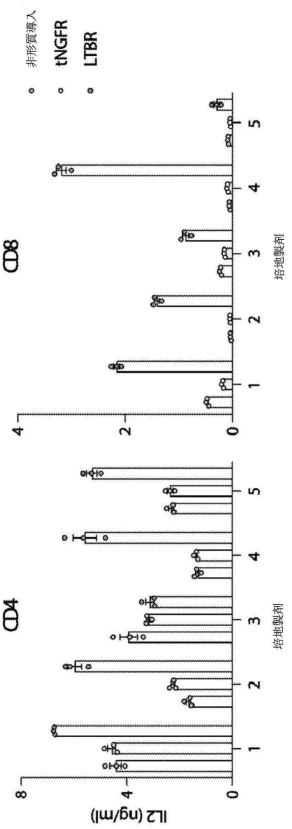
【図２３】



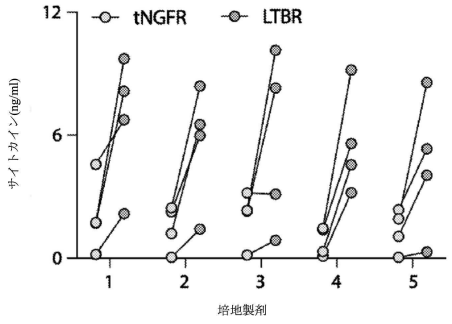
【図２４Ａ】



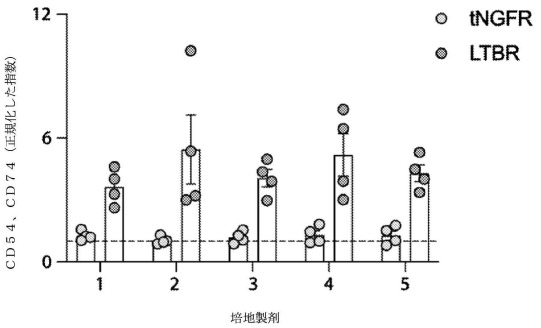
【図２４Ｂ】



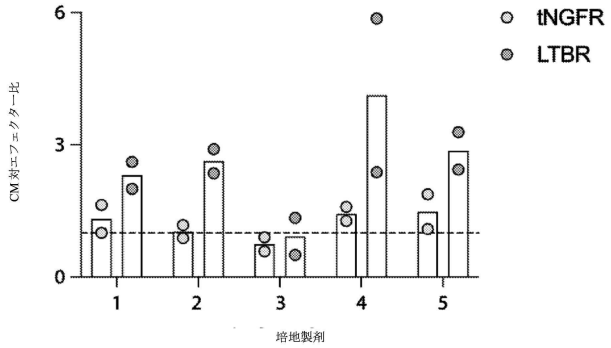
【図２４Ｃ】



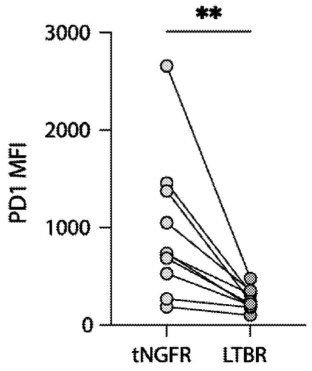
【図２４Ｄ】



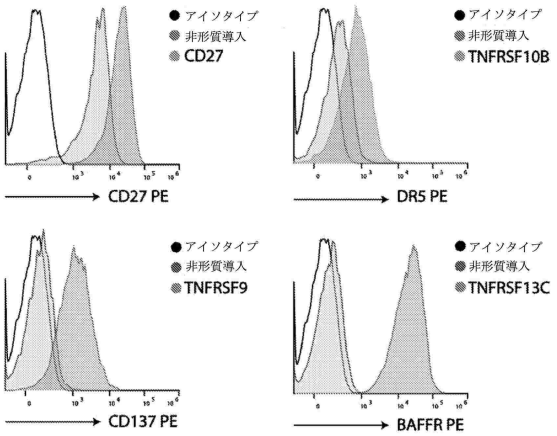
【図２４Ｅ】



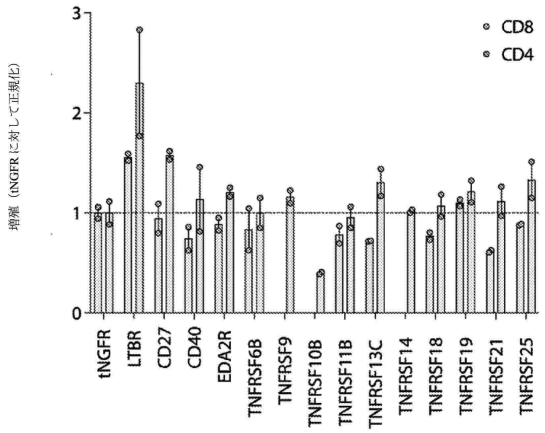
【図２４Ｆ】



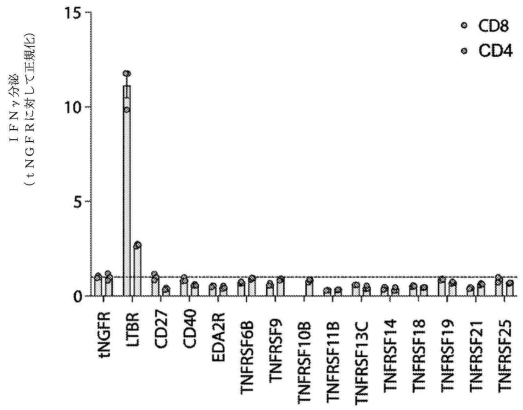
【図２５Ａ】



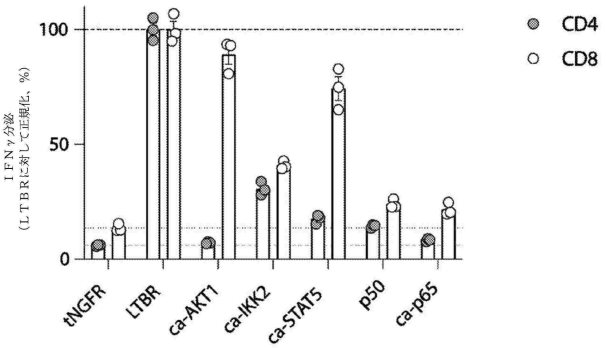
【図２５Ｂ】



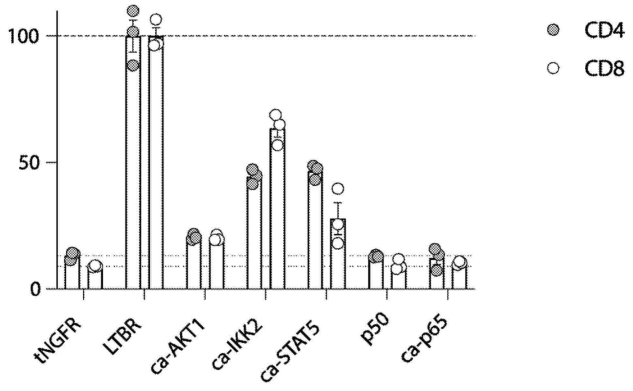
【図２５Ｃ】



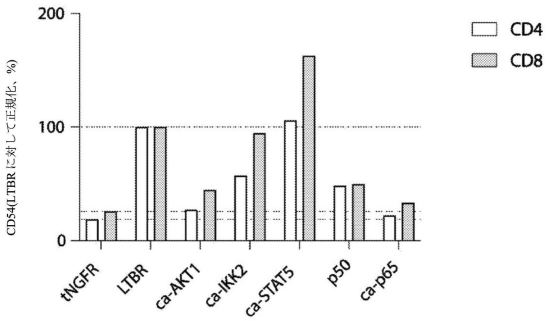
【図２６Ａ】



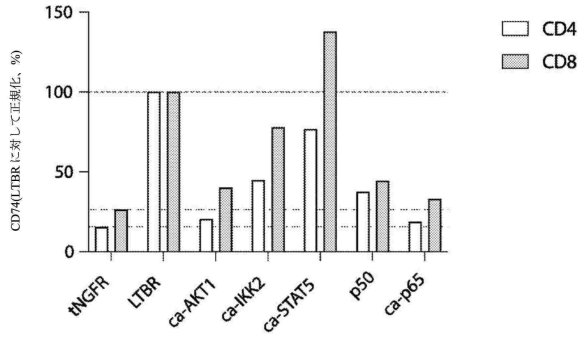
【図２６Ｂ】



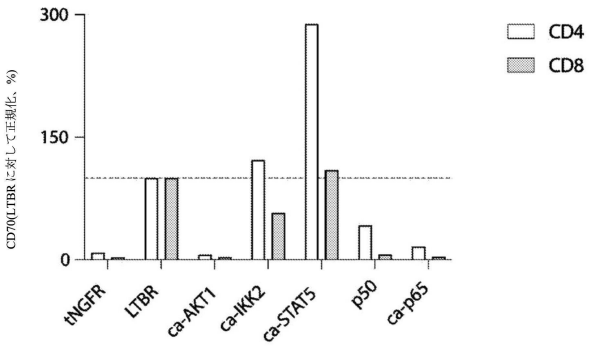
【図２６Ｃ】



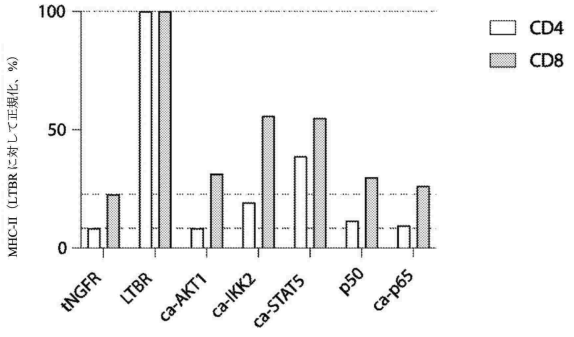
【図２６Ｄ】



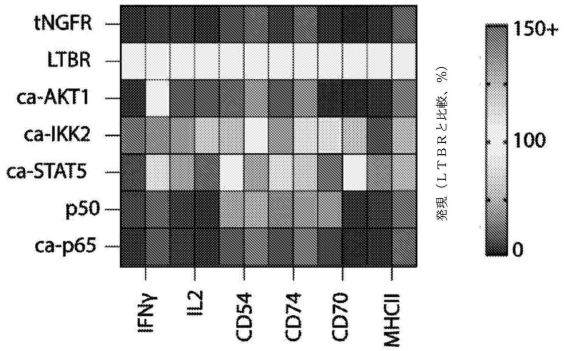
【図２６Ｅ】



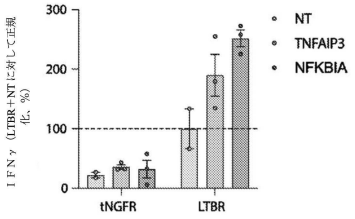
【図２６Ｆ】



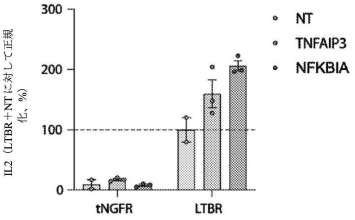
【図２６Ｇ】



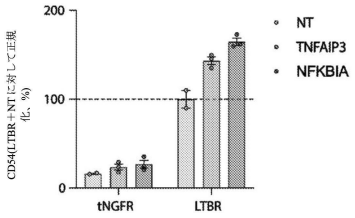
【図２７Ａ】



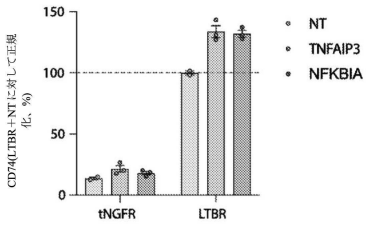
【図２７Ｂ】



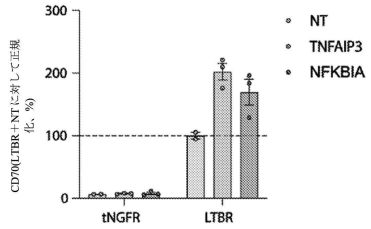
【図２７Ｃ】



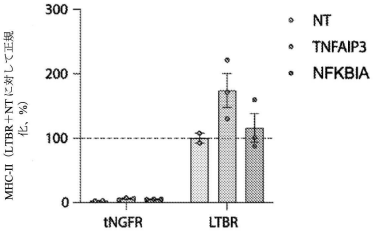
【図２７Ｄ】



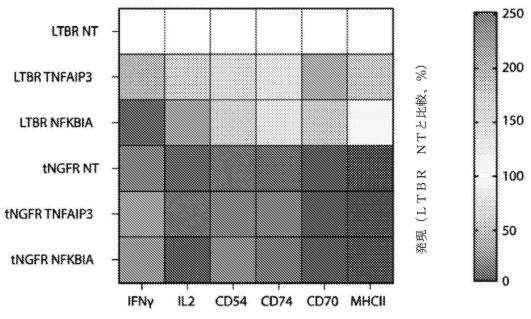
【図２７Ｅ】



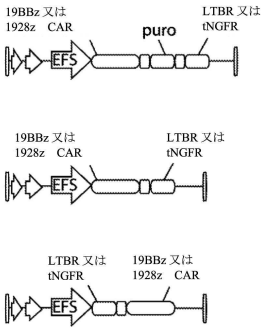
【図２７Ｆ】



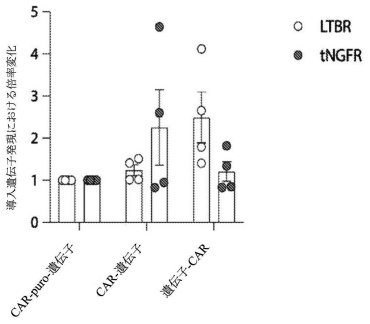
【図２７Ｇ】



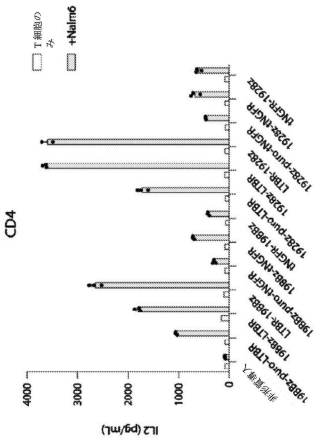
【図２８Ａ】



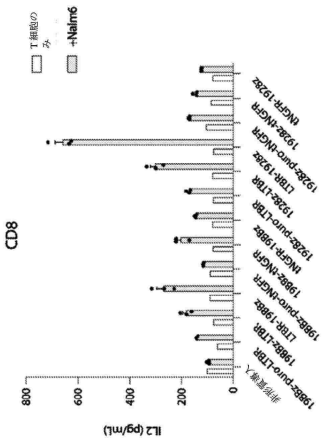
【図２８Ｂ】



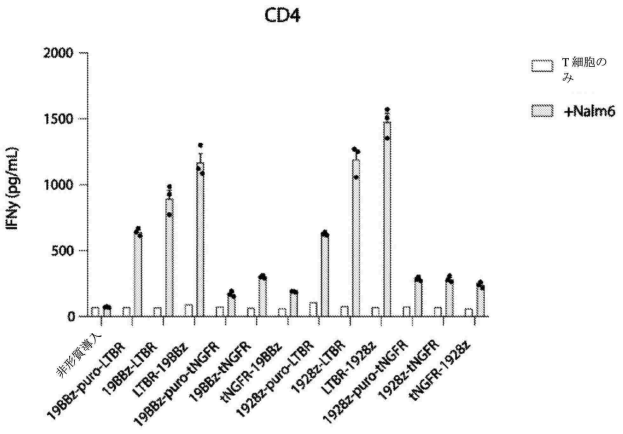
【図２８Ｃ】



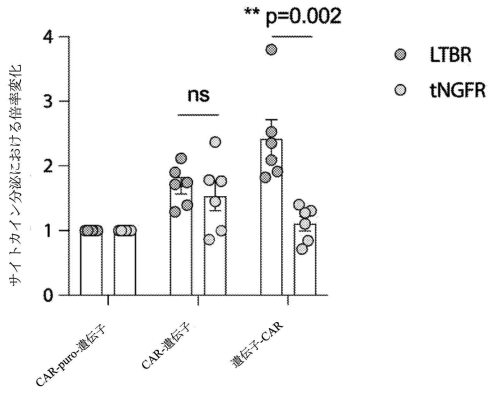
【図２８Ｄ】



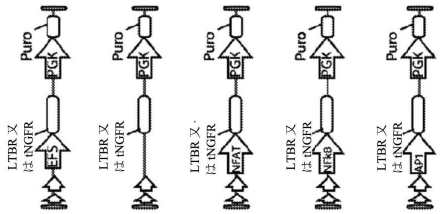
【図２８Ｅ】



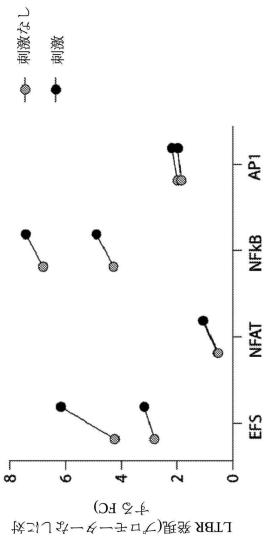
【図２８Ｆ】



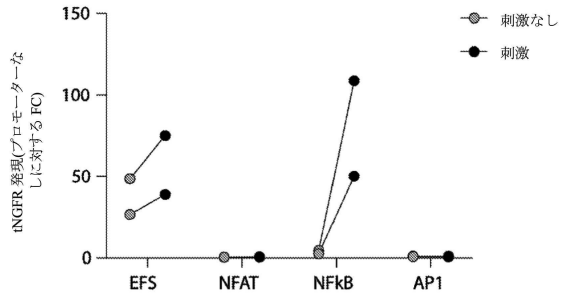
【図２９Ａ】



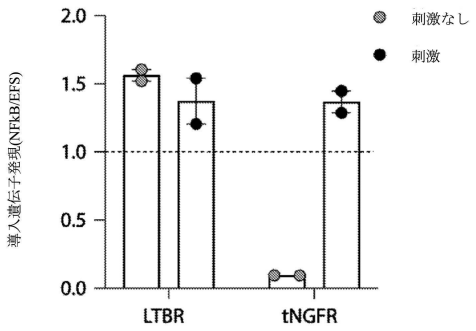
【図２９Ｂ】



【図２９Ｃ】



【図２９Ｄ】



【配列表】

<u>20245285340000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - A61K 35/17; C12N 15/84; C12N 5/078 (2022.01)
ADD. - C12N 5/10; G01N 33/68; G01N 33/577 (2022.01)

CPC - INV. - A61K 35/17; C12N 5/0636; C12N 15/85 (2022.08)
ADD. - G01N 33/577; G01N 33/68; C12N 5/10 (2022.08)

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2020/0354676 A1 (CHINEO MEDICAL TECHNOLOGY CO. LTD.) 12 November 2020 (12.11.2020) entire document	1-4, 8, 15, 16
A	US 2020/0237821 A1 (EUTILEX CO. LTD.) 30 July 2020 (30.07.2020) entire document	1-4, 8, 15, 16
A	US 2020/0246382 A1 (KITE PHARMA INC.) 06 August 2020 (06.08.2020) entire document	1-4, 8, 15, 16
A	US 2019/0144515 A1 (KITE PHARMA INC.) 16 May 2019 (16.05.2019) entire document	1-4, 8, 15, 16
P, X	US 2022/0162288 A1 (CATAMARAN BIO INC.) 26 May 2022 (26.05.2022) entire document	1-4, 8, 15, 16

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 October 2022	NOV 04 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NO: 2 was searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
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:

3. ☒ Claims Nos.: 5-7, 9, 10, 18-23, 36, 37, 41-45, 50
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:

See extra sheet(s).

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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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.:

1-4, 8, 15, 16

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Claims 1-4, 8, 15, and 16 have been analyzed subject to the restriction that the claims read on a modified lymphocyte comprising an exogenous nucleic acid encoding an LTBR domain selected to be amino acids 249 to 435 of SEQ ID NO: 2, and methods comprising the same.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-4, 8, 11-17, and 24-35 are drawn to modified lymphocytes and methods comprising the same.

Group II: claims 38-40 and 46-49 are drawn to methods of identifying genes which alter therapeutic function, and analyzing the effect on an individual cell of overexpression of an ORF of interest.

The first invention of Group I+ is restricted to a modified lymphocyte comprising an exogenous nucleic acid encoding an LTBR domain selected to be amino acids 249 to 435 of SEQ ID NO: 2, and methods comprising the same. It is believed that claims 1-4, 8, 15, and 16, read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on amino acids 249 to 435 of SEQ ID NO: 2.

Applicant is invited to elect additional LBTR domains, T cell receptors, therapeutics, genes, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs, where applicable, to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a modified lymphocyte comprising an exogenous nucleic acid encoding an LTBR domain selected to be amino acids 249 to 392 of SEQ ID NO: 2, and methods comprising the same. Additional LBTR domains, T cell receptors, therapeutics, genes, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs, where applicable will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for improving immunotherapies, requiring the selection of alternative LBTR domains and genes where "the LTBR intracellular domain comprises amino acids 249 to 435 of SEQ ID NO: 2, or a fragment, deletion, or variant thereof," and "An expression cassette comprising a nucleotide sequence encoding a chimeric antigen receptor and a nucleic acid encoding a gene of Table 1."

The special technical features of Groups I+, an LTBR domain, are not present in Group II, and the special technical features of Group II, method of identifying a gene that alters the therapeutic function, are not present in Groups I+.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a modified lymphocyte comprising an exogenous nucleic acid encoding LTBR; an expression cassette comprising a nucleotide sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR) and a nucleic acid encoding LTBR; an expression cassette comprising a nucleic acid encoding a T cell receptor and a nucleic acid encoding LTBR; an expression cassette comprising a nucleic acid encoding a viral protein and a nucleic acid encoding LTBR; a method of producing a modified lymphocyte comprising introducing an exogenous nucleic acid encoding LTBR into the cell; a method of increasing the response to a vaccine composition comprising co-administering to a subject a vaccine comprising a nucleic acid encoding LTBR; a modified lymphocyte comprising an exogenous nucleic acid encoding a gene; an expression cassette comprising a nucleotide sequence encoding a chimeric antigen receptor and a nucleic acid encoding a gene; an expression cassette comprising a nucleic acid encoding a T cell receptor and a nucleic acid encoding a gene; an expression cassette comprising a nucleic acid encoding a viral protein and a nucleic acid encoding a gene; a method of producing a modified lymphocyte comprising introducing an exogenous nucleic acid encoding a gene into the lymphocyte. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2020/0246382 A1 to Kite Pharma Inc. discloses a modified lymphocyte (the cell that is modified is a lymphocyte, Para. [0078]) comprising an exogenous nucleic acid encoding LTBR (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleotide sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR) (cells comprising the CAR, Para. [0021]) and a nucleic acid encoding LTBR (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleic acid encoding a T cell receptor (cells comprising the CAR, Para. [0021]) and a nucleic acid encoding LTBR (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleic acid encoding a viral protein (the linkers include the picornaviral 2A-like linker, CHYSEL sequences of porcine teschovirus (P2A), virus (T2A), Para. [0076]) and a nucleic acid encoding LTBR (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); a method of producing a modified lymphocyte (methods and process for producing antibody agents as disclosed herein, e.g., by transformation (e.g., transduction) of a cell with a vector or nucleic acid of the present disclosure. In some embodiments, a method or process for producing antibody agents as disclosed herein comprises transforming (e.g., transducing) a cell with a nucleic acid (e.g., a nucleic acid present in a vector) encoding at least one antigen binding system provided herein, Para. [0208]) comprising introducing an exogenous nucleic acid encoding LTBR into the cell (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); a method of increasing the response to a vaccine composition (a method of inducing an immunity against a tumor comprising administering to a subject an effective amount of a cell comprising a polynucleotide, a vector, or a polypeptide of the present disclosure, Para. [0021]) comprising co-administering to a subject a vaccine comprising a nucleic acid encoding LTBR (a method of inducing an immunity against a tumor comprising administering to a subject an effective amount of a cell comprising a polynucleotide, a vector, or a polypeptide of the present disclosure, Para. [0021]; cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); a modified lymphocyte (the cell that is modified is a lymphocyte, Para. [0078]) comprising an exogenous nucleic acid encoding a gene (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleotide sequence encoding a chimeric antigen receptor (cells comprising the CAR, Para. [0021]) and a nucleic acid encoding a gene (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleic acid encoding a T cell receptor (cells comprising the CAR, Para. [0021]) and a nucleic acid encoding a gene (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); an expression cassette (a vector comprising such a nucleic acid, Para. [0009]) comprising a nucleic acid encoding a viral protein (the linkers include the picornaviral 2A-like linker, CHYSEL sequences of porcine teschovirus (P2A), virus (T2A), Para. [0076]) and a nucleic acid encoding a gene (cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]); a method of producing a modified lymphocyte (a method of inducing an immunity against a tumor comprising administering to a subject an effective amount of a cell comprising a polynucleotide, a vector, or a polypeptide of the present disclosure,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073294

Para. [0021]) comprising introducing an exogenous nucleic acid encoding a gene into the lymphocyte (a method of inducing an immunity against a tumor comprising administering to a subject an effective amount of a cell comprising a polynucleotide, a vector, or a polypeptide of the present disclosure, Para. [0021]; cell can be modified to express an exogenous construct, Para. [0078]; LTBR, Para. [0091]).

The inventions listed in Groups I+ and II therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6837(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6837	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*31/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12		
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		

(32)優先日　令和4年3月15日(2022.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＮＯＮＩＤＥＴ
２．ＴＷＥＥＮ

ル・ワシントンスクエアビレッジ４
(72)発明者　レグット，マテウシュ
アメリカ合衆国ニュージャージー州０７３０２ジャージーシティ・アパートメント４０２・ニューアークアベニュー２４５

Ｆターム（参考）　4B063　QA13 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS32 QX02
4B065　AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C087　AA01 AA02 AA03 BB37 DA31 NA05 NA14 ZB07 ZB26 ZB33