

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7430136号  
(P7430136)

(45)発行日 令和6年2月9日(2024.2.9)

(24)登録日 令和6年2月1日(2024.2.1)

(51)国際特許分類		F I	
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02 Z N A
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/48 M
請求項の数 9 (全201頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-523389(P2020-523389)	(73)特許権者	500429103
(86)(22)出願日	平成30年10月26日(2018.10.26)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ
(65)公表番号	特表2021-501318(P2021-501318		ティ オブ ペンシルバニア
	A)		アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)		ニア州 フィラデルフィア シビック セ
(86)国際出願番号	PCT/US2018/057850		ンター ブールバード 3 6 0 0 ナインス
(87)国際公開番号	WO2019/084493		フロア
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和3年10月26日(2021.10.26)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/578,193	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成29年10月27日(2017.10.27)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100119507
	米国(US)		弁理士 刑部 俊
(31)優先権主張番号	62/578,212	(74)代理人	100142929
(32)優先日	平成29年10月27日(2017.10.27)		弁理士 井上 隆一
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 疲弊したT細胞に関連する疾患を治療するための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

疾患を有する対象からのT細胞を含む試料において疾患状態に特徴的な疲弊したT細胞 (T<sub>EX</sub>) 集団を同定する方法であって、該方法が、

(a) 疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

(b) (i) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、およびLAG-3<sup>+</sup>;

10

(ii) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、およびTCF1<sup>+</sup>;

(iii) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、およびPtger2<sup>+</sup>;

(iv) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>+</sup>;

(v) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>+</sup>;

(vi) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、およびCD28<sup>+</sup>;

(vii) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、Gzm

20

K<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、およびPD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;

( v i i i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>+</sup>;

( i x ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、およびKi67;

( x ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、およびTox<sup>int</sup>; ならびに

( x i ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、およびPerforin<sup>+</sup>

からなる群から選択されるマーカーのセットを検出する段階であって、該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現が、増加した発現の強度を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される、段階と、

10

( c ) 疾患に特徴的な1つまたは複数のT細胞集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT細胞集団が、T細胞を含む対照試料において同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の数と比較して、疾患を有する対象からのT細胞におけるパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT細胞を含む、段階と、

を含む、方法。

#### 【請求項2】

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含む、請求項1に記載の方法。

20

#### 【請求項3】

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む、請求項2に記載の方法。

#### 【請求項4】

急性ウイルス感染症または慢性ウイルス感染症を有する対象において疾患の進行を監視するための方法であって、疾患状態に特徴的なT細胞集団が疲弊したT細胞(T<sub>EX</sub>)集団であり、該方法が、

( a ) 第1の時点において、前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

30

( b ) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

( c ) 疾患に特徴的な1つまたは複数のT細胞集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT細胞集団が、T細胞を含む対照試料において同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の数と比較して、疾患を有する対象からのT細胞におけるパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT細胞を含む、段階と、

( d ) 段階( a )、( b )、および( c )を第2のまたは後の時点で繰り返し、前記疾患が進行しているか、または疾患が進行していないか、を決定する段階であって、前記対象からのT細胞を含む第2のまたは後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料よりも、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団において、より多数の細胞を含む場合に、疾患が進行しており、前記対象からのT細胞を含む第2のまたは後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料よりも、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団において、より少数の細胞を含む場合に、疾患が進行していない、段階と、

40

を含む、

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

( i ) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、およびLAG-3<sup>+</sup>;

50

( i i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>-</sup>;

( i i i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、およびKi67;ならびに

( i v ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、およびPD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>

からなる群から選択される、T<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の疾患関連集団(DAT)に特徴的な、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含む、方法。

#### 【請求項 5】

前記疾患が、急性ウイルス感染症である、請求項 4 に記載の方法。

#### 【請求項 6】

前記疾患が、慢性ウイルス感染症である、請求項 4 に記載の方法。

#### 【請求項 7】

前記感染症が、インフルエンザウイルスによる感染症を含む急性ウイルス感染症であるか、または前記慢性ウイルス感染症がHIVによるものであり、かつ前記対象が抗レトロウイルス療法(ART)で処置中である、請求項 4 に記載の方法であって、

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

( v ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、およびPerforin<sup>+</sup>;

( v i ) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、およびTCF1<sup>+</sup>;ならびに

( v i i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>+</sup>からなる群から選択される、T<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の健康関連集団(HAT)に特徴的な、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、をさらに含み、

前記方法が、HATに対するDATの比率を計算する段階をさらに含み、HATに対するDATの比率が、対象からのT細胞を含む第1の試料と比較して第2のまたは後の試料において増加する場合に、疾患が進行しており、HATに対するDATの比率が、対象からのT細胞を含む第1の試料と比較して第2のまたは後の試料において減少する場合に、疾患が進行していない、方法。

#### 【請求項 8】

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含む、請求項 4 に記載の方法。

#### 【請求項 9】

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む、請求項 4 に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 関連出願の相互参照

この出願は、全体が引用によりそれぞれ本明細書に組み込まれる、2017年10月27日に提出された米国仮出願第62/578,193号、2017年10月27日に提出された米国仮出願第62/578,212号、2018年4月20日に提出された米国仮出願第62/660,754号、および2018年4月23日に提出された米国仮出願第62/661,467号の優先権を主張する。

#### 【0002】

#### 連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する声明

この発明は、国立衛生研究所(NIH)から授与された助成金番号AI105343およびAI082630に基づく政府の支援を受けて行われた。政府は本発明に所定の権利を有する。

#### 【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

## 背景

T細胞機能不全の獲得状態であるT細胞疲弊 (T cell exhaustion) は、癌および慢性ウイルス感染の特徴である (Wherry et al. (2007) *Immunity* 27:670-684 (非特許文献1); Zajac et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188:2205-2213 (非特許文献2))。近年、癌におけるT細胞疲弊を逆転させるための処置が著しく効果的であることが証明されている (Barber et al. (2006) *Nature* 439:682-687 (非特許文献3); Topalian et al. (2012) *New Engl. J. Med.* 366:2443-2454 (非特許文献4))。キメラ抗原受容体 (CAR) - T細胞療法も、血液悪性腫瘍に対して極めて効果的であることが証明されている (Porter et al. (2011) *New Engl. J. Med.* 365:725-733 (非特許文献5)) が、固形腫瘍を治療するための操作されたT細胞における疲弊の開発は、その広範な使用に対する重要な障壁のままである (Long et al. (2015) *Nat. Med.* 21:581-590 (非特許文献6))。T細胞疲弊を調節するメカニズムを同定することは、免疫チェックポイント遮断および癌免疫治療のための養子T細胞療法の有効性を改善することができるであろう (Barber et al. (2006) *Nature* 439:682-687 (非特許文献3); Topalian et al. (2012) *New Engl. J. Med.* 366:2443-2454 (非特許文献4); Porter et al. (2011) *New Engl. J. Med.* 365:725-733 (非特許文献5))。

10

## 【 0 0 0 4 】

T細胞疲弊を調節するための現在の戦略は、免疫チェックポイントなどのエフェクター遺伝子発現産物の発現を直接調節することに依存しており、そのようなエフェクター遺伝子発現産物の生理的レベルは通常のT細胞機能にしばしば必要とされるため、このような調節は望ましくない副作用を引き起こす。さらに、そのような戦略は薬剤耐性に対して脆弱であり、免疫病理学につながり得る。したがって、T細胞またはそのような遺伝子発現産物の生理学的に関連するレベルを維持するT細胞に影響を与える細胞におけるエフェクター遺伝子発現産物の発現を調節するために役立つ組成物および方法を同定する当技術分野における大きな必要性がある。

20

## 【 0 0 0 5 】

疲弊したCD8 T細胞 (T<sub>EX</sub>) は、慢性感染症および癌の間に発達し、疾患の最適な制御を妨げる。これらの細胞には機能的な欠陥があり、複数の抑制性受容体 (IR) を共発現し、そして、転写、エピジェネティック、代謝、および分化プログラムを変化させる (Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015) *Nat Rev Immunol* 15:486-499 (非特許文献7))。新規の免疫療法は、PD-1またはCTLA-4などのT<sub>EX</sub>によって発現されるIRを標的とし、他の状況において潜在的な用途を伴い、がん患者に劇的な効果をもたらしている (Callahan, M.K. et al. (2016) *Immunity* 44:1069-1078 (非特許文献8); Sharma P., and Allison, J.P. (2015) *Science* 348:56-61 (非特許文献9))。T<sub>EX</sub>は動物モデルにおいてチェックポイント封鎖に対する応答に関係しているが、ヒトにおけるIR標的化に続く治療応答または不全の根本的な免疫学的メカニズムはほとんど理解されていない。T<sub>EX</sub>はまた、ヒトの慢性ウイルス感染においても重要な役割を果たす。

30

## 【 0 0 0 6 】

疾患に関連するT細胞を同定および追跡する必要性がある。対象においてT細胞およびT細胞のコレクションを同定および追跡する方法を利用する、疾患の進行を処置および監視する方法も依然として必要とされている。

40

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【 文献 】 Wherry et al. (2007) *Immunity* 27:670-684【 文献 】 Zajac et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188:2205-2213【 文献 】 Barber et al. (2006) *Nature* 439:682-687【 文献 】 Topalian et al. (2012) *New Engl. J. Med.* 366:2443-2454【 文献 】 Porter et al. (2011) *New Engl. J. Med.* 365:725-733

50



【文献】Long et al. (2015) Nat. Med. 21:581-590

【文献】Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015) Nat Rev Immunol 15:486-499

【文献】Callahan, M.K. et al. (2016) Immunity 44:1069-1078

【文献】Sharma P., and Allison, J.P. (2015) Science 348:56-61

【発明の概要】

【0008】

#### 概要

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的な疲弊した (exhausted) T細胞 (T<sub>EX</sub>) 集団を同定する方法を供する。その方法は、

(a) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(b) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT細胞疲弊特異的 (T<sub>EX</sub>) マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

(c) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

(d) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数のT<sub>EX</sub>集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT<sub>EX</sub>細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞におけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT<sub>EX</sub>細胞を含む、段階と、を含む。

【0009】

特定の実施形態において、前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはマーカーの組み合わせは、CD45RA<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>-</sup>、Tim-3<sup>MMI</sup>、LAG-3<sup>MMI</sup>、TCF1<sup>MMI</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD26<sup>+</sup>、CD7<sup>MMI</sup>、CD127<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Granzyme B<sup>+</sup> (GzmB<sup>+</sup>)、T-bet<sup>+</sup>、Granzyme K<sup>+</sup> (GzmK<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、Eomesodermin<sup>+</sup> (Eomes<sup>+</sup>)、2B4<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>、Granzyme M<sup>+</sup> (GzmM<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>、CD200R<sup>MMI</sup>、CD103<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>MMI</sup>、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>MMI</sup>、CD39<sup>+</sup>、CD36<sup>+</sup>、および P tger2<sup>MMI</sup>からなる群から選択され、ここで、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせは、発現の増加を示す ( + ) および発現の減少を示す ( - ) を用いる手動のゲーティングにより、または中央金属強度 ( median metal intensity ) ( MMI ) により評価される。

【0010】

特定の実施形態において、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および / または、1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはマーカーの組み合わせは、表4に列記されるものである。特定の実施形態において、疲弊特異的遺伝子または疲弊特異的遺伝子のセットは、図41Cに列記されるものである。

【0011】

特定の実施形態において、前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせは、CD27<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、およびCD103<sup>+</sup>からなる群から選択され、かつ、前記1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせは、CTLA-4<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、CD73<sup>-</sup>、CD127<sup>-</sup>、CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、XCL1<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、CCR7<sup>-</sup>、IL-21<sup>+</sup>、TCF1<sup>-</sup>、CXCL10<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、Amphiregulin<sup>+</sup> (Areg<sup>+</sup>)、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>、および P tger2<sup>+</sup>からなる群から選択され、ここで、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせは、発現の増加を示す ( + ) および発現の減少を示す ( - ) を用いる手動のゲーティングにより評

10

20

30

40

50

価される。

#### 【0012】

特定の実施形態において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせおよび1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせを含む前記マーカーのパネルは、

- (a) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>;
- (b) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;
- (c) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>;
- (d) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;
- (e) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>;
- (f) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>;
- (g) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;
- (h) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;
- (i) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;
- (j) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>int</sup>; および
- (k) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、ここで、該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現は、増加した発現を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される。

#### 【0013】

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的なT細胞集団を同定する方法も供する。その方法は、

- (a) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、
- (b) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、
- (c) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、
- (d) 疾患に特徴的な1つまたは複数のT細胞集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT細胞集団が、T細胞を含む対照試料において同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の数と比較して、疾患を有する対象からのT細胞におけるパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT細胞を含む、段階と、を含む。

#### 【0014】

特定の実施形態において、前記パネルは、2B4、CCR7、CD103、CD127、CD16、CD160、CD200R、CD26、CD27、CD28、CD36、CD38、CD45RA、CD57、CD7、CD73、CTLA-4、CXCR5、Eomes、GzmB、GzmK、GzmM、Helios、HLA-DR、Ki67、KLRG1、LAG-3、PD-1、Perforin、PTGER2、T-bet、TCF-1、TIGIT、TIM-3、TOX、2B4/CD160/TIGIT、CD160/TIGIT、CD38/39、CD45RA/CD27、PD-1/CD127、PD-1/CD39、および PD-1/Eomesからなる群から選択される少なくとも3つのマーカー

またはマーカーの組み合わせを含む。

【 0 0 1 5 】

特定の実施形態において、前記マーカーのパネルは、

- ( a ) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>;
- ( b ) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;
- ( c ) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>;
- ( d ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;
- ( e ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>;
- ( f ) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>;
- ( g ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;
- ( h ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;
- ( i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;
- ( j ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>int</sup>; および
- ( k ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>

10

20

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、ここで、該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現は、増加した発現を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される。

【 0 0 1 6 】

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法も供する。その方法は、

- ( a ) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、
- ( b ) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、1つまたは複数のT細胞疲弊特異的(T<sub>EX</sub>)マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、
- ( c ) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、
- ( d ) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数のT<sub>EX</sub>集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT<sub>EX</sub>細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞におけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT<sub>EX</sub>細胞を含む、段階と、
- ( e ) 段階( a )、( b )、( c )、および( d )を1つまたは複数の後続の時点で繰り返す段階と、
- ( f ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料より、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団においてより多数の細胞を含む場合に、疾患が進行していることを決定する段階と、
- ( g ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料より、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団においてより少数の細胞を含む場合に、疾患が進行していないことを決定する段階と、を含む。

30

40

【 0 0 1 7 】

特定の実施形態において、前記マーカーのパネルは、少なくとも1セットの、

50

- ( a ) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、およびLAG-3<sup>+</sup>;  
 ( b ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>-</sup>;  
 ( c ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;  
 ( d ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、および PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>

からなる群から選択されるT<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の疾患関連集団 ( DAT ) の特徴を示す、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含み、かつ、

10

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

- ( e ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>;  
 ( f ) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>; および  
 ( g ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>.

からなる群から選択されるT<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の健康関連集団 ( HAT ) の特徴を示す、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、をさらに含む。

【 0 0 1 8 】

20

特定の実施形態において、前記方法は、HATに対するDATの比率を計算する段階をさらに含む。特定の実施形態において、HATに対するDATの比率が対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において増加する場合に疾患は進行しており、HATに対するDATの比率が対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において減少する場合に疾患は進行していない。

【 0 0 1 9 】

対象のT細胞の疲弊状態を決定する方法も供する。その方法は、

- ( a ) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、  
 ( b ) 該T細胞を刺激または活性化する段階と、  
 ( c ) T細胞による、IFN<sup>-</sup>、TNF<sup>-</sup>、IL-2、IL-10、IL-21、CCL3、CCL4、XCL1、およびアンフィレギュリンからなる群から選択される1つまたは複数のサイトカインおよび1つまたは複数のケモカインの生産を測定する段階と、  
 ( d ) 次式：

30

$$FES=[(2 \times (\%IFN^{+}TNF^{-})-(\%IFN^{-}TNF^{+})-(\%IL-2^{+})) \times (\%CCL3/4^{+})]$$

( 式中、「%IFN<sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>」は、TNF<sup>-</sup>ではなくIFN<sup>+</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%IFN<sup>-</sup>TNF<sup>+</sup>」は、IFN<sup>+</sup>ではなくTNF<sup>+</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%IL-2<sup>+</sup>」は、IL-2を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%CCL3/4<sup>+</sup>」は、CCL3および/またはCCL4を産生する細胞の割合(%)を示す )

のとおり機能疲弊スコア ( FES ) を計算する段階と、

- ( e ) 対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階であって、FES = 0は対象のT細胞が疲弊していることを示し、FESが高いほど対象のT細胞の疲弊の程度が増加していることを示す、段階と、  
 を含む。

40

【 0 0 2 0 】

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法も供する。その方法は、

- ( a ) 前記対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、  
 ( b ) 上記の方法により該対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階と、  
 ( c ) 段階 ( a ) および ( b ) を1つまたは複数の後続の時点で繰り返す段階と、  
 ( d ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して増加したFESを含む場合に、疾患が進行してい

50

ることを決定する段階、または

(e) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して減少したFESを含む場合に、疾患が進行していないと決定する段階と、を含む。

【0021】

先の実施形態のいずれか1つにおいては、対象からのT細胞を含む試料は、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含み得る。特定の実施形態において、対象からのT細胞を含む試料は、CD8+T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む。

【0022】

疲弊したT細胞のエピジェネティックなフットプリント特性を同定するための方法も供する。その方法は、(a) 疲弊したT細胞(T<sub>EX</sub>)を含む試料および活化された(invigorated)(すなわち、正常な、消耗していない)T細胞を含む対照試料を得る段階と、(b) 両方の試料においてオープンクロマチン領域(OCR)を同定する段階と、(c) T<sub>EX</sub>において同定されたOCRを、活化されたT細胞において同定されたOCRと比較する段階と、を含み、ここで、前記T<sub>EX</sub>のエピジェネティックなフットプリント特性が、T<sub>EX</sub>に存在し、対照T細胞には存在しない1つまたは複数のOCRを含む。

【0023】

患者において疲弊したT細胞を検出するための方法も供する。その方法は、OCRフットプリントを検出する段階を含み、ここで、該OCRフットプリントは、疲弊したT細胞と関連する。

[本発明1001]

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的な疲弊したT細胞(T<sub>EX</sub>)集団を同定する方法であって、該方法が、

(a) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(b) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT細胞疲弊特異的(T<sub>EX</sub>)マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

(c) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

(d) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数のT<sub>EX</sub>集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT<sub>EX</sub>細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞におけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT<sub>EX</sub>細胞を含む、段階と、を含む、方法。

[本発明1002]

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8+T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記T細胞系統特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの1つまたは複数の組み合わせが、2、3、4、または5のT細胞系統特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーを含む、本発明1001~1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み

10

20

30

40

50

合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはマーカーの組み合わせが、CD45RA<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>-</sup>、Tim-3<sup>MMI</sup>、LAG-3<sup>MMI</sup>、TCF1<sup>MMI</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD26<sup>+</sup>、CD7<sup>MMI</sup>、CD127<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Granzyme B<sup>+</sup>(GzmB<sup>+</sup>)、T-bet<sup>+</sup>、Granzyme K<sup>+</sup>(GzmK<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、Eomesodermin<sup>+</sup>(Eomes<sup>+</sup>)、2B4<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>、Granzyme M<sup>+</sup>(GzmM<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>、CD200R<sup>MMI</sup>、CD103<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>MMI</sup>、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>MMI</sup>、CD39<sup>+</sup>、CD36<sup>+</sup>、およびPtger2<sup>MMI</sup>からなる群から選択され、かつ、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現が、発現の増加を示す(+)および発現の減少を示す(-)を用いる手動のゲーティングにより、または中央金属強度(median metal intensity)(MMI)により評価される、本発明1001、1002、1003、または1004のいずれかの方法。

10

[本発明1006]

前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせが、CD27<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、およびCD103<sup>+</sup>からなる群から選択され、かつ、前記1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせが、CTLA-4<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、CD73<sup>-</sup>、CD127<sup>-</sup>、CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、XCL1<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、CCR7<sup>-</sup>、IL-21<sup>+</sup>、TCF1<sup>-</sup>、CXCL10<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、Amphiregulin<sup>+</sup>(Areg<sup>+</sup>)、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>、およびPtger2<sup>+</sup>からなる群から選択され、かつ、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現が、発現の増加を示す(+)および発現の減少を示す(-)を用いる手動のゲーティングにより評価される、本発明1001、1002、1003、または1004のいずれかの方法。

20

[本発明1007]

1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせおよび1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせを含む前記マーカーのパネルが、

(a) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>;

(b) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;

30

(c) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>;

(d) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

(e) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>;

(f) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>;

(g) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;

(h) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

40

(i) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67<sup>+</sup>;

(j) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>int</sup>;

(k) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>;

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、かつ、

該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現が、増加した発現を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される、本発明1005の方法。

[本発明1008]

50

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的なT細胞集団を同定する方法であって、該方法が、

(a) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(b) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

(c) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

(d) 疾患に特徴的な1つまたは複数のT細胞集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT細胞集団が、T細胞を含む対照試料において同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の数と比較して、疾患を有する対象からのT細胞におけるパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT細胞を含む、段階と、

を含む、方法。

[本発明1009]

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含む、本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記T細胞系統特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの1つまたは複数の組み合わせが、2、3、4、または5のT細胞系統特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーを含む、本発明1008～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記パネルが、2B4、CCR7、CD103、CD127、CD16、CD160、CD200R、CD26、CD27、CD28、CD36、CD38、CD45RA、CD57、CD7、CD73、CTLA-4、CXCR5、Eomes、GzmB、GzmK、GzmM、Helios、HLA-DR、Ki67、KLRG1、LAG-3、PD-1、Perforin、PTGER2、T-bet、TCF-1、TIGIT、TIM-3、TOX、2B4/CD160/TIGIT、CD160/TIGIT、CD38/39、CD45RA/CD27、PD-1/CD127、PD-1/CD39、およびPD-1/Eomesからなる群から選択される少なくとも3つのマーカーまたはマーカーの組み合わせを含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

前記パネルが、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10のマーカーまたはマーカーの組み合わせを含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記パネルが、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20のマーカーまたはマーカーの組み合わせを含む、本発明1012の方法。

[本発明1015]

前記マーカーのパネルが、

(a) PD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、TIGIT<sup>±</sup>、TCF1<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>±</sup>、CTLA-4<sup>±</sup>、Tim-3<sup>±</sup>、LAG-3<sup>±</sup>;

(b) PD-1<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、TIGIT<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、CXCR5<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、CD27<sup>±</sup>、TCF1<sup>±</sup>;

(c) CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、CXCR5<sup>±</sup>、Helios<sup>±</sup>、PD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>±</sup>、Ptger2<sup>±</sup>;

(d) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、Perforin<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>±</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

10

20

30

40

50

- ( e ) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>±</sup>;  
 ( f ) PD-1<sup>±</sup>、PD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CD39<sup>±</sup>、Ki67<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CTLA-4<sup>±</sup>、CD103<sup>±</sup>、  
 CD200R<sup>±</sup>、Tim-3<sup>±</sup>、Lag-3<sup>±</sup>、CD28<sup>±</sup>;  
 ( g ) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、Ki  
 67<sup>±</sup>、HLA-DR<sup>±</sup>、CXCR5<sup>±</sup>、PD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>;  
 ( h ) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>;  
 ( i ) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Helios<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、Perforin  
<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;  
 ( j ) TIGIT<sup>±</sup>、Eomes<sup>±</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、T-bet<sup>±</sup>、Tox<sup>int</sup>、および  
 ( k ) TIGIT<sup>±</sup>、Eomes<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、T-bet<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>  
 、Perforin<sup>±</sup>

10

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、かつ、

該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現が、増加した発現を示す(+)、(++)、  
 または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる  
 手動のゲーティングによって評価される、本発明1013または1014の方法。

[本発明1016]

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法であって、該方法が、

- ( a ) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、  
 ( b ) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的  
 マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、1つまたは複数のT細胞  
 疲弊特異的(T<sub>EX</sub>)マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーの  
 パネルの発現を測定する段階と、  
 ( c ) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネ  
 ルの発現と比較する段階と、  
 ( d ) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数のT<sub>EX</sub>集団を同定する段階であって、該疾患に  
 特徴的なT<sub>EX</sub>集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは  
 複数のマーカーを発現するT<sub>EX</sub>細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞に  
 おけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方  
 制御されている、より多数のT<sub>EX</sub>細胞を含む、段階と、  
 ( e ) 段階( a )、( b )、( c )、および( d )を1つまたは複数の後続の時点で繰り  
 返す段階と、  
 ( f ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を  
 含む第1の試料または前の試料よりも、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団において、より多数の  
 細胞を含む場合に、疾患が進行していると決定する段階と、  
 ( g ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を  
 含む第1の試料または前の試料よりも、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団において、より少数の  
 細胞を含む場合に、疾患が進行していないと決定する段階と、  
 を含む、方法。

20

30

[本発明1017]

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞  
 洗浄液、または組織を含む、本発明1016の方法。

40

[本発明1018]

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球、または腫瘍浸  
 潤リンパ球(TIL)を含む、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記疾患が、急性ウイルス感染症または慢性ウイルス感染症である、本発明1016、101  
 7、または1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

前記疾患が、急性ウイルス感染症である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

50



前記急性ウイルス感染症が、インフルエンザウイルスによる感染症を含む、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記疾患が、慢性ウイルス感染症である、本発明1019の方法。

[本発明1023]

前記慢性ウイルス感染症が、サイトメガロウイルス(CMV)またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染による感染症を含む、本発明1022の方法。

[本発明1024]

前記慢性ウイルス感染症が、HIVによるものであり、前記対象が抗レトロウイルス療法(ART)で処置中である、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

(a) PD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、TIGIT<sup>±</sup>、TCF1<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、CD7<sup>±</sup>、Helios<sup>±</sup>、CD103<sup>±</sup>、Ptger2<sup>±</sup>、CTLA-4<sup>±</sup>、Tim-3<sup>±</sup>、およびLAG-3<sup>±</sup>;

(b) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、Perforin<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>±</sup>、およびGzmK<sup>-</sup>;

(c) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Helios<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、Perforin<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;

(d) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、CD38<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、Ki67<sup>±</sup>、HLA-DR<sup>±</sup>、CXCR5<sup>±</sup>、およびPD-1<sup>±</sup>/CD39<sup>±</sup>

からなる群から選択される、T<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の疾患関連集団(DAT)に特徴的な、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含み、かつ、

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

(e) TIGIT<sup>±</sup>、Eomes<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、T-bet<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、CD16<sup>±</sup>、CD57<sup>±</sup>、Perforin<sup>±</sup>;

(f) PD-1<sup>±</sup>、CD160<sup>±</sup>、TIGIT<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>、CXCR5<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>、CD27<sup>±</sup>、TCF1<sup>±</sup>; および

(g) PD-1<sup>±</sup>/Eomes<sup>±</sup>、2B4<sup>±</sup>/CD160<sup>±</sup>/TIGIT<sup>±</sup>、GzmB<sup>±</sup>、Tox<sup>±</sup>、GzmK<sup>±</sup>

からなる群から選択される、T<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の健康関連集団(HAT)に特徴的な、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、をさらに含む、本発明1020または1024の方法。

[本発明1026]

HATに対するDATの比率を計算する段階をさらに含む、本発明1025の方法。

[本発明1027]

HATに対するDATの比率が、対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において増加する場合に、疾患が進行しており、HATに対するDATの比率が、対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において減少する場合に、疾患が進行していない、本発明1026の方法。

[本発明1028]

対象のT細胞の疲弊状態を決定する方法であって、該方法が、

(a) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(b) 該T細胞を刺激または活性化する段階と、

(c) T細胞による、IFN<sup>±</sup>、TNF<sup>±</sup>、IL-2、IL-10、IL-21、CCL3、CCL4、XCL1、およびアンフィレギュリンからなる群から選択される1つまたは複数のサイトカインおよび1つまたは複数のケモカインの生産を測定する段階と、

(d) 次式:

$$FES = [(2 \times (\%IFN^{\pm}TNF^{-}) - (\%IFN^{-}TNF^{\pm}) - (\%IL-2^{\pm})) \times (\%CCL3/4^{\pm})]$$

(式中、「%IFN<sup>±</sup>TNF<sup>-</sup>」は、TNF<sup>-</sup>ではなくIFN<sup>±</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%IFN<sup>-</sup>TNF<sup>±</sup>」は、IFN<sup>-</sup>ではなくTNF<sup>±</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%I

10

20

30

40

50

L-2<sup>+</sup>」は、IL-2を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%CCL3/4<sup>+</sup>」は、CCL3および/またはCCL4を産生する細胞の割合(%)を示す)

のとおりに機能疲弊スコア(FES)を計算する段階と、

(e) 対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階であって、FES 0は対象のT細胞が疲弊していることを示し、FESが高いほど対象のT細胞の疲弊の程度が増加していることを示す段階と、

を含む、方法。

[本発明1029]

前記対象からのT細胞を含む試料が、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含む、本発明1028の方法。

10

[本発明1030]

前記対象からのT細胞を含む試料が、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む、本発明1029の方法。

[本発明1031]

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法であって、該方法が、

(a) 前記対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(b) 本発明1028の方法により該対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階と、

(c) 段階(a)および(b)を1つまたは複数の後続の時点で繰り返す段階と、

(d) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して増加したFESを含む場合に、疾患が進行していると決定する段階、または

20

(e) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して減少したFESを含む場合に、疾患が進行していないと決定する段階と、

を含む、方法。

[本発明1032]

前記疾患が、癌、ウイルス感染症、細菌感染症、および寄生体感染症からなる群から選択される、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記疾患がウイルス感染症である、本発明1032の方法。

30

[本発明1034]

前記ウイルス感染症が、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオーマウイルス、アネロウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、およびインフルエンザウイルスからなる群から選択されるウイルスによるものである、本発明1033の方法。

[本発明1035]

前記ウイルスが、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、GB型肝炎ウイルスA(GBV-A)、GB型肝炎ウイルスB(GBV-B)、およびGB型肝炎ウイルスC(GBV-C)からなる群から選択される肝炎ウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1036]

40

前記ウイルスが、アルファヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV2)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ベータヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス6、ヒトヘルペスウイルス7、ガンマヘルペスウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、およびヒトヘルペスウイルス8からなる群から選択されるヘルペスウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1037]

前記ウイルスが、BKウイルス(BKV)、JCウイルス(JCV)、KIポリオーマウイルス(KIPyV)、WUウイルス(WUPyV)、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCPyV)、ヒトポリオーマウイルス6(HPyV6)、ヒトポリオーマウイルス7(HPyV7)、毛髪異形成棘状ウイルス(trichodysplasia spinulosa virus: TSPyV)、ヒトポリオーマウイルス

50

9 (HPyV9)、およびMWウイルス (MWPyV) からなる群から選択されるポリオーマウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1038]

前記ウイルスが、アデノウイルス血清型A、アデノウイルス血清型B、アデノウイルス血清型C、アデノウイルス血清型D、アデノウイルス血清型E、アデノウイルス血清型F、およびアデノウイルス血清型Gからなる群から選択されるアデノウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1039]

前記ウイルスが、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、レンチウイルス、およびスプ

10

マウイルスからなる群から選択されるレトロウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1040]  
前記レトロウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) およびウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV) からなる群から選択されるレンチウイルスである、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記ウイルスが、インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、インフルエンザウイルスC、およびインフルエンザウイルスDからなる群から選択されるインフルエンザウイルスである、本発明1034の方法。

[本発明1042]

前記疾患が、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*; MTB)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*)、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*)、およびコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) からなる群から選択される細菌感染症である、本発明1032の方法。

20

[本発明1043]

前記疾患が、原生動物および蠕虫からなる群から選択される寄生体感染症である、本発明1032の方法。

[本発明1044]

前記原生動物が、アカントアメーバ種 (*Acanthamoeba* spp.)、バラムチア・マンドリラリス (*Balamuthia mandrillaris*)、ブラストシスチス種 (*Blastocystis* spp.)、クリプトスポリジウム種 (*Cryptosporidium* spp.)、二核アメーバ (*Dientamoeba fragilis*)、エントアメーバ・ヒストリチカ (*Entamoeba histolytica*)、ジアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*)、リーシュマニア種 (*Leishmania* spp.)、ネグレリア・フォーレリ (*Naegleria fowleri*)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、二日熱マラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、トキソプラズマ・ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、トリコモナス・ヴァギナリス (*Trichomonas vaginalis*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、およびトリパノソーマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*) からなる群から選択される、本発明1043の方法。

30

[本発明1045]

前記蠕虫が、条虫、吸虫、および回虫からなる群から選択される、本発明1043の方法。

[本発明1046]

前記疾患が癌である、本発明1032の方法。

[本発明1047]

前記癌が免疫チェックポイント阻害剤での治療に対して応答性である、本発明1046の方法。

[本発明1048]

40

50

前記免疫チェックポイント阻害剤での治療に対して応答性の癌が、切除不能な黒色腫、転移性黒色腫、ステージIII黒色腫、転移性非小細胞肺癌（NSCLC）、NSCLC、頭頸部の再発性扁平上皮がん（SCCHN）、転移性腎細胞がん（RCC）、尿路上皮がん、肝細胞がん（HCC）、膀胱がん、結腸直腸がん、卵巣がん、および内皮がんからなる群から選択される、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記癌が、マイクロサテライト不安定性（MSI）を示す、本発明1046の方法。

[本発明1050]

前記疾患を治療する段階をさらに含む、本発明1032の方法。

[本発明1051]

疲弊したT細胞のエピジェネティックなフットプリント特性を同定するための方法であって、該方法が、

（a）疲弊したT細胞（T<sub>EX</sub>）を含む試料および活化された（invigorated）（すなわち、正常な、疲弊していない）T細胞を含む対照試料を得る段階と、

（b）両方の試料においてオープンクロマチン領域（OCR）を同定する段階と、

（c）T<sub>EX</sub>において同定されたOCRを、活化されたT細胞において同定されたOCRと比較する段階と、

を含み、前記T<sub>EX</sub>のエピジェネティックなフットプリント特性が、T<sub>EX</sub>に存在し対照T細胞には存在しない1つまたは複数のOCRを含む、方法。

[本発明1052]

前記OCRが、（a）ATAC-seqライブラリーを作製し、（b）qPCRを実行し、そして、（c）配列決定すること、によって同定される、本発明1051の方法。

[本発明1053]

患者において疲弊したT細胞を検出するための方法であって、該方法が、OCRフットプリントを検出する段階を含み、該OCRフットプリントが、疲弊したT細胞と相関する、方法。

[本発明1054]

前記患者からのT細胞における前記OCRフットプリントが、該患者からの前記T細胞の集団からのクロマチンライブラリーに対して定量的PCR（qPCR）を行うことを含む方法によって決定される、本発明1053の方法。

[本発明1055]

前記qPCRの増幅産物に対してハイスループットアレイベースの試験を行う段階をさらに含む、本発明1054の方法。

[本発明1056]

多遺伝子座qPCR試験を行う段階をさらに含む、本発明1054の方法。

[本発明1057]

患者において疾患を治療するための方法であって、

（i）先の本発明のいずれかの方法により患者において疲弊したT細胞を検出する段階と

—

（ii）該疲弊したT細胞を再活化する（reinvigorating）段階と、

を含む方法。

[本発明1058]

前記T細胞が、患者またはT細胞に薬物を投与することにより、または、T細胞のゲノム操作により、再活化される、本発明1057の方法。

[本発明1059]

前記薬物が5-アザシチジン（Aza）、ゼブラリン、DNMT1阻害剤、たとえば、RG108、BETファミリータンパク質阻害剤、たとえば、I-BET726（BET726の阻害剤）、ヒストンアセチラーゼ（HAT）阻害剤、たとえば、クルクミン、ガルシノール、もしくはアナカルジアック酸、PCAFおよびp300を阻害するイソチオゾロン、Lys-CoA、C464、ヒストンメチル化阻害剤、たとえば、3-デアゼパノクリンA（DZNep）、HDAC阻害剤、たと

10

20

30

40

50

えば、アミノスベロイルヒドロキサム酸、スベラニロヒドロキサム酸 (SAHA、商品名 Vorinostat)、またはACY-1215 (HDAC6の阻害剤)である、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記ゲノム操作が、エピジェネティック経路における遺伝子をロックアウトすること、エピジェネティック経路における遺伝子をロックインすること、エピジェネティック経路におけるタンパク質コード遺伝子の機能を改変すること、エピジェネティックレギュレーターの発現を制御する位置における非コーディングゲノムを標的とすること、を含む、本発明1058の方法。

[本発明1061]

前記ゲノム編集が、CRISPR/Cas9ターゲティングを介して行われる、本発明1058または1060の方法。

[本発明1062]

患者において疾患を治療するための方法であって、該方法が、本発明1053~1061のいずれかの方法により患者における疲弊したT細胞を同定する段階を含み、ここで、高優先度のエピジェネティック経路が同定され、T細胞が操作され、ここで、該高優先度のエピジェネティック経路が標的とされ、そして、該操作されたT細胞が患者に投与される、方法。

[本発明1063]

患者において疲弊したT細胞を検出するための方法であって、該方法が、OCRパネルを含むオープンクロマチン領域 (OCR) アッセイを用いて、対照T細胞と比較して疲弊したT細胞に特有のOCRフットプリントを同定する段階を含む、方法。

[本発明1064]

前記疲弊したT細胞に特有のOCRフットプリントが、患者からの疲弊したT細胞からのクロマチンライブラリーに対してqPCRを行うこと、および、対照細胞からのクロマチンライブラリーに対してqPCRを行うことを含む方法により決定される、本発明1063の方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むと、よりよく理解されるであろう。本発明を説明する目的で、現在好ましい実施形態が図面に示されている。しかしながら、本発明は、図面に示される実施形態の正確な配置および手段に限定されないことを理解されたい。

【0025】

【図1-1】図1A~1Fは、抗PD-L1処置がTEXの転写プロファイルに及ぼす影響を示す一連の画像である。図1Aは、対照または抗PD-L1抗体による処理の前 (15日pi) または治療後 (34日pi) にマウスから単離されたPBMC上のCD8+細胞にゲートされた代表的なフローサイトメトリープロット (上) またはD<sup>b</sup>GP276四量体+細胞にゲートされたヒストグラム (下) を示す。図1Bは、PBMCにおけるCD8+細胞のD<sup>b</sup>GP276四量体+細胞 (上) およびD<sup>b</sup>GP276四量体+細胞のKi-67+ (下) の頻度を示す図1Aの定量化を示す。図1Cは、図1Bに示されるマウスからの血清処置前 (12日目) および処置後 (38日目) におけるウイルス負荷 (プラーク形成単位/ml) を示す。図1Bおよび図1Cにおけるドットを結ぶ線は、同じマウスの処置前後のデータを示す。グループ間の対応t検定によって決定された有意性を示すアスタリスクは、\*\*p 0.01 および\*\*\*p 0.001であり。データは、グループあたり少なくとも5匹のマウスでの少なくとも3つの独立した実験の代表である。図1Dは、マイクロアレイデータにおける倍率変化に基づいて有意に差次的に発現された上位の遺伝子を示す列正規化ヒートマップを示す。選択された遺伝子が表示される。Pauken et al. Table S1(Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)において利用可能な倍数変化およびp値を伴う遺伝子の完全なリスト。図1Eは、TEX対TNにおけるメタジーンと比較した、対照-vs抗PD-L1処理TEXにおいて同定されたメタジーンのオーバーラップを示すCircosプロットを示す。TEX対TNの転写データは、Doering et al.から入手した(Doering et al. Immu

10

20

30

40

50

nity 2012, 37:1130-1144)。図 1 F は、Doering et al. (Doering et al. Immunity 2012, 37:1130-1144)からの $T_{EFF}$ 、 $T_{MEM}$ 、または $T_{EX}$ を $T_N$ と比較、および本願の図 2 A ~ 2 J からの抗PD-L1で処理された $T_{EX}$ を対照処理 $T_{EX}$ と比較したメタジーンのパ値およびFDR q値を示す。メタジーンのメンバーシップおよびオーバーラップの詳細は、Pauken et al. Table S4 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)に見出すことができる。

【図 1 - 2】図 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 - 3】図 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 - 4】図 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 - 1】図 2 A ~ 2 J は、処置の停止後に持続されない抗PD-L1によって誘導された $T_{EX}$ 細胞におけるエフェクター様転写プログラムを示す一連の画像である。図 2 A は、対照または抗PD-L1処理 $T_{EX}$ 上のマイクロアレイからの1-ピアソン相関によるコンセンサス階層的クラスタリングを示す。図 2 B は、代表的なGene Ontology (GO) タームのGene Set Enrichment Analysis (GSEA) を示す。図 2 C は、エフェクター遺伝子のGSEAを示す。図 2 D は、エフェクター関連遺伝子の列正規化ヒートマップを示す。図 2 E は、 $T_{EFF}$  (左) および $T_{MEM}$ 細胞 (右) におけるメタジーンと比較した、抗PD-L1処理 $T_{EX}$ で同定されたメタジーンにおける重複を示すCircosプロットを示す。Circosプロットの領域を結びリボンは、グループ間で共有されている遺伝子を示す。マイクロアレイには、実験ごとに1グループあたり10 ~ 12 匹のマウスを用いた4つの独立した実験が含まれる。図 2 F は、CD8<sup>+</sup> T細胞のうちのP14細胞の頻度を示し、図 2 G は、末梢血中のKi67<sup>+</sup> P14細胞を示す。灰色のバーは抗体処理期間を示す。図 2 H は、IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  + P14細胞の定量化を示す。図 2 I は、腎臓におけるウイルス負荷を示す。図 2 F ~ 2 G のデータは、1つの代表的な実験である。図 2 H ~ 2 I において、+1日の時点は2つの代表的な実験から組み合わされ、+20週の時点は1つの代表的な実験からのものである。図 2 F ~ 2 I のデータは、実験ごとにグループごとに少なくとも4匹のマウスを用いた少なくとも2つの独立した実験の代表である。図 2 J は、RNA-seqの主成分分析を示し、分散 (変数) の%で示される。「方法」において示されるように、RNA-seqは1グループあたり5 ~ 13 匹のマウスを用いる2 ~ 4 回の独立した実験で行った。各ドットは独立した実験を表す。グループ間の対応のないt検定によって決定された有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および\*\*\*p 0.001である。

【図 2 - 2】図 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 - 3】図 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 - 4】図 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 - 5】図 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 - 6】図 2 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 E は、抗PD-L1処置の中止後のウイルス特異的CD8<sup>+</sup> T細胞の再疲弊を表す一連の画像である。図 3 A は、抗PD-L1処置の中止後1日または20週の脾臓におけるP14s (Ly5.1<sup>+</sup>細胞) を示すCD8<sup>+</sup> T細胞にゲートされた代表的なフローサイトメトリープロットを示す。図 3 B は、図 3 A に示されるマウスからの脾臓におけるP14頻度 (左) および数 (右) の定量化を示す。図 3 C は、脾臓におけるKi-67 (左) およびグランザイムB (右) のフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。図 3 D は、図 3 C の定量化を示す。図 3 E は、gp33-41ペプチドによるエキスピボ刺激後のP14細胞にゲートされた代表的なフローサイトメトリープロットを示し、図 2 I において定量化されたIFN $\gamma$  およびTNF $\alpha$  産生を示す。図 3 A ~ 3 E に示されるマウスは、図 2 H および2 I に示されるマウスに対応する。+1日の時点は2つの代表的な実験からの組み合わせであり、+20週の時点は1つの代表的な実験のものである。データは、実験ごとにグループごとに少なくとも4匹のマウスを用いた少なくとも2つの独立した実験の代表である。グループ間の対応のないt検定によって決定された有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および\*\*\*p 0.001である。

【図 3 - 2】図 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 3 - 3】図 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 C は、抗PD-L1処理後の阻害性受容体発現を示す一連の画像である。図 4 A は、処置の中止後2日（左）または20週（右）の脾臓におけるP14細胞上の抑制性受容体の共発現を示す。代表的なヒストグラム（上）および複数のマウスからの相乗平均蛍光強度（MFI）の定量化（下）は、クローン13感染中の抗PD-L1処置後、図 4 B に示すような、2日、または図 4 C に示すような、20週、における、PD-1、Lag-3、Tim-3、および2B4を示す。Arm免疫マウスは、P14細胞にゲートされた、30+ 日p.iであった。データは、Arm免疫グループあたり少なくとも3匹のマウス、および、クローン13グループあたり少なくとも5匹のマウスを用いた2つの独立した実験の代表である。統計的有意性は、ノンパラメトリック一元配置分散分析（one-way ANOVA）を用いて決定された。グループ間の有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および\*\*\*p 0.001 である。青いアスタリスクはANOVA p値を示し、黒いアスタリスクはテスト後のp値を示す。

10

【図 4 B】図 4 A の説明を参照のこと。

【図 4 C】図 4 A の説明を参照のこと。

【図 5 - 1】図 5 A ~ 5 F は、内因性ウイルス特異的CD8 T細胞の再活化が、抗原が高いままである場合、時間とともに衰えることを示す一連の画像である。抗PD-L1処理後の2日間（末梢血中）、7週間（脾臓）、または18週間（脾臓）での内因性ウイルス特異的CD8 T細胞応答のモニタリング。図 5 A は、D<sup>b</sup>GP276 四量体およびCD44を示す代表的なプロットを示す。図 5 B は、全CD8+集団のD<sup>b</sup>GP276+（上）およびD<sup>b</sup>GP33+（下）の頻度の定量化を示す。図 5 C は、D<sup>b</sup>GP276+細胞でゲートされた、PD-1発現の代表的なヒストグラムを示す。図 5 D は、D<sup>b</sup>GP276+細胞（上）またはD<sup>b</sup>GP33+細胞（下）でゲートされた、PD-1のジオメトリックMFIの定量化を示す。図 5 E は、Ki-67発現を示す代表的なヒストグラムを示す。図 5 F は、Ki-67+D<sup>b</sup>GP276+（上）またはD<sup>b</sup>GP33+（下）の頻度の定量化を示す。データは、グループあたり少なくとも4匹のマウスを用いた2つの独立した実験の代表である。グループ間の対応のないt検定によって決定された有意性を示すアスタリスクは、\*\*\*p 0.001 である。

20

【図 5 - 2】図 5 - 1 の説明を参照のこと。

【図 5 - 3】図 5 - 1 の説明を参照のこと。

30

【図 6 - 1】図 6 A ~ 6 E は、マイクロアレイまたはRNA-seqによって生成された対照および抗PD-L1処理されたTEX細胞の転写プロファイルの比較を示す一連の画像である。図 6 A は、2週間の処置期間の1日後に単離された対照または抗PD-L1処置マウスからのTEX間の（1-ピアソン相関による）分散によるRNA-seqからの遺伝子のコンセンサス階層的クラスタリングを示す。図 6 B は、マイクロアレイにおいて評価された遺伝子の重複、および処置後1日のマウスからのRNA-seqデータセットを示す。図 6 C は、マイクロアレイおよびRNA-seqデータセットにおける抗PD-L1処理後の示差的に発現された遺伝子（p < 0.05）の対数倍変化（LFC）の比較を示す。差次的に発現された遺伝子の完全なリストは、マイクロアレイについてPauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)、およびRNA-seqにつ

40

【図 6 - 2】図 6 - 1 の説明を参照のこと。

50

【図 6 - 3】図 6 - 1 の説明を参照のこと。

【図 7 A】図 7 A ~ 7 E は、RNA - seq を用いる抗 PD - L1 処理を伴うまたは伴わない、TEX の転写プロファイルの時間的変化を表す一連の画像である。図 7 A は、処置の中止の 1 日後または 18 ~ 29 週後の対照または抗 PD-L1 処置マウスからの TEX 間の (1-ピアソン相関による) 分散による RNA-seq からの遺伝子のコンセンサス階層的クラスタリングを示す。左に示す 4 つのグループすべてのクラスタ化、右にボックス化して示される、対照および処置後 18 ~ 29 週の抗 PD-L1 処置 TEX の対での比較。図 7 B は、クラスネイバー分析 (class neighbor analysis) のヒートマップを示し、対照、または抗 PD-L1 処理の中止の 1 日後もしくは 18 ~ 29 週後の抗 PD-L1 処理 TEX において差次的に発現された上位の遺伝子を示す。遺伝子の完全なリストは、Pauken et al. Table S5 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) において利用可能である。図 7 C は、示された処置および時点の間の一対比較における有意に変化した遺伝子の数を比較する表を示す。遺伝子の完全なリストは、Pauken et al. Table S5 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) において利用可能である。図 7 D は、RNA-seq のヒートマップを示し、処置の 1 日後の抗 PD-L1 処置後の差次的に発現される上位の遺伝子、および処置の 18 ~ 29 週後のこれらの遺伝子の対応する発現を示す。図 7 E は、処置後 1 日または 18 ~ 29 週の対照 TEX に関連する上位 GO タームを示す。短期対長期、抗 PD-L1 対対照処理 TEX の一対比較の完全なリストは、Pauken et al. Table S6 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) において利用可能である。

【図 7 B】図 7 A の説明を参照のこと。

【図 7 C】図 7 A の説明を参照のこと。

【図 7 D】図 7 A の説明を参照のこと。

【図 7 E】図 7 A の説明を参照のこと。

【図 8 - 1】図 8 A ~ 8 H は、IL - 7 i . c での組み合わせ処置を示す一連の画像であり、抗 PD-L1 は、インビボでウイルス特異的 CD8 T 細胞応答を増強する。図 8 A は、図 2 A および 2 B についての実験計画を示す。図 8 B は、IL-7 または IL-15 での 30 分間のエクスピボ刺激の後 39 日 p.i. で単離された脾臓からの P14 細胞にゲートされた代表的なフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。陰の灰色のヒストグラムは未刺激の対照であり、色付きのヒストグラムはサイトカインで刺激されている。図 1 F に示す複数のマウスの定量。図 8 C は、抗 PD-L1 および IL-7 i.c. との組み合わせ治療の実験計画の概略図を示す。図 8 D は、D<sup>b</sup>GP276 + 細胞および P14 細胞 (Ly5.1+) を示す CD8+T 細胞でゲーティングされた代表的なフローサイトメトリープロットを示す。ゲートの横の数字は、CD8+親母集団の各集団の頻度を示す。図 8 E は、対照、IL-7 i.c. 抗 PD-L1、または抗 PD-L1 と IL-7 i.c. との両方による処置後の脾臓における生存細胞の総数を示す。データは正常に分布していたため、パラメトリックな一元配置分散分析 (one-way ANOVA) およびグループを比較するためのボンフェローニの多重比較検定を用いて有意性を決定した。図 8 F は、図 8 E に示されるマウスからの D<sup>b</sup>GP276+CD8 T 細胞の頻度 (左) および数 (右) を示す。図 8 G は、図 8 E のマウスの処置後の腎臓におけるウイルス負荷を示す。図 8 F および図 8 G では、ノンパラメトリック一元配置分散分析 (Kruskal-Wallis test) および Dunn の多重検定比較を用いて、グループを比較して有意性を決定した。図 8 E ~ 図 8 G では、青いアスタリスク (上の列) は ANOVA の p 値を示し、黒いアスタリスクはテスト後の p 値を示す。図 8 H は、図 8 E のマウスの処置前および処置後の血清中のウイルス負荷を示す。ラインは、同じマウスからの一連の測定を繋ぐ。有意性は、各処置グループについて対応のあるスチューデントの t 検定を用いて決定された。図 8 D ~ 図 8 H からのデータは、グループあたり少なくとも 4 匹のマウスで 2 つの独立した実験から組み合わせたものである。これらのデータは、図 9 G および 9 H に示すマウスに対応する。有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および\*\*\*p 0.001 である。

【図 8 - 2】図 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 - 3】図 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 8 - 4】図 8 - 1 の説明を参照のこと。



【図 9 - 1】図 9 A ~ 9 H は、PD - 1 経路遮断が T<sub>EX</sub>における抗原非依存性の持続性および IL - 7 シグナル伝達を適度に改善することを示す一連の画像である。図 9 A は、移行後 27 日目（1 日目と比較）の 100 万個の PBMC あたりの D<sup>b</sup>GP33 + ドナー CD8 T 細胞の数を示し、図 9 B は、脾臓から回収された数を示す。図 9 C は、T<sub>MEM</sub> P14 細胞またはバルク CD44<sup>lo</sup>CD62L + T<sub>N</sub> 細胞（LCMV Arm 後 167 日）と比較した T<sub>EX</sub> P14 細胞（クローン 13 後 35 日）での CD127 および CD122 発現のヒストグラムを示す。値は、平均の幾何平均蛍光強度（MFI）および平均の標準誤差（SEM）を示す。図 9 D は、図 9 C のマウスからの PD-1 対 CD127 の等高線図を示す。図 9 E は、図 9 D の定量化を示す。図 9 A ~ 図 9 E のデータは、グループあたり少なくとも 4 匹のマウスを用いた少なくとも 2 回の独立した実験の代表である。図 9 F は、IL-7 または IL-15 での 30 分間のエキスピボ刺激後 39 日 p.i. の P14 細胞による phospho-STAT5 誘導の定量化を示す。値は、未刺激の対照に対する変化の倍数を示す。（図 9 G）2 週間の処置後の脾臓における P14 細胞の頻度（CD8 +、左）および数（右）。図 9 H は、エキスピボペプチド刺激後の図 9 G からの IFN + TNF + P14 細胞のプロット（左）および定量化（右）を示す。図 9 F ~ 図 9 H は、グループごとに少なくとも 4 匹のマウスを用いた 2 つの独立した実験からの組み合わせである。有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および \*\*\*p 0.001 であり、Supplemental Methods of Pauken et al. (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) に記載されるように決定した。青いアスタリスクは ANOVA p 値を示し、黒いアスタリスクはテスト後の p 値を示す。

10

【図 9 - 2】図 9 - 1 の説明を参照のこと。

20

【図 9 - 3】図 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 9 - 4】図 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 9 - 5】図 9 - 1 の説明を参照のこと。

【図 10 - 1】図 10 A ~ 10 J は、PD - 1 経路遮断が記憶様想起能力を回復すること、または T<sub>EX</sub>のエピジェネティックな景観を T<sub>EFF</sub>または T<sub>MEM</sub>細胞に再プログラムすること、ができないことを示す一連の画像である。図 10 A ~ 図 10 D は、レシピエントのマウスが移行の 3 . 5 週後にリステリア GP33 で再チャレンジされたことを除いて、ここで使用された図 8 A で概説された実験計画を描く。図 10 A は、リステリア GP33 での再チャレンジ後 6 日での応答する T<sub>MEM</sub>、T<sub>EX</sub>または抗 PD - L1 処理 T<sub>EX</sub>のフローサイトメトリプロットを示す。図 10 B は、エキスピボのペプチド刺激の後の図 10 A のマウスからの P14 細胞にゲートされた連結フローサイトメトリプロットを示す。図 10 C は、図 10 A に示される脾臓におけるドナー（Ly5 . 2 +）D<sup>b</sup>GP33 + CD8 T 細胞の定量化を示す。図 10 D は、図 10 B に示される IFN + P14 細胞の定量化を示す。図 10 E は、図 9 B に示されるマウスからのドナー D<sup>b</sup>GP33 + 細胞上の PD - 1 のヒストグラムを示す。値は、平均的な幾何学的 MFI および SEM を示す。データは、グループあたり少なくとも 4 匹のマウスを用いた 2 つの独立した実験の代表である。有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および \*\*\*p 0.001 であり、Supplemental Methods of Pauken et al. (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) に記載されるように決定した。青いアスタリスクは ANOVA p 値を示し、黒いアスタリスクはテスト後の p 値を示す。図 10 F は、T<sub>N</sub>細胞（LFC 2）と比較した ATAC-seq オープンクロマチン領域（OCR）の Venn 図を示す。2 つの複製からのデータが結合されている。図 10 G は、Ifng および Pcdcl 遺伝子座で示されるグループごとの 1 つの独立した複製からの代表的な ATAC - seq トラックを示す。図 10 H は、ATAC - seq データセットにおける OCR の富化を示す分散の共クラスター分析を示す。実線は細胞型を分離し、複製を並べて示している。図 10 I は、図 10 H からの ATAC - seq 富化を示すボックスおよびウイスキー（whisker）図を示す。ひげ（whisker）は四分位範囲を表す。図 10 J は、すべての OCR の主成分分析を示す。図 10 I および図 10 J では、各複製が示される。ATAC seq データは、本明細書の他所に記載されるように、グループあたり 2 ~ 15 匹のマウスを用いた 2 つの独立した実験からのデータである。

30

40

【図 10 - 2】図 10 - 1 の説明を参照のこと。

50

【図10-3】図10-1の説明を参照のこと。

【図10-4】図10-1の説明を参照のこと。

【図10-5】図10-1の説明を参照のこと。

【図10-6】図10-1の説明を参照のこと。

【図10-7】図10-1の説明を参照のこと。

【図10-8】図10-1の説明を参照のこと。

【図11A】図11A～11Bは、ATAC-seqデータの品質管理分析を示す一連の画像である。図11Aは、ATAC-seqについて生成された各生物学的複製について求められた、すべての対のリード、整列された数、整列された%、およびピークの数  
を示す表を示す。図11Bは、各細胞型についての複製物1と複製物2との間の正規化された  
ATAC-seqピーク富化の相関を示す。R2は、複製間の相関の程度を示す。

10

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図12A】図12A～12Cは、ATAC-seqデータの領域分布を示す一連の画像  
である。図12Aは、細胞型ごとの遺伝子間、イントロン、エキソン、およびプロモター  
/TSS領域におけるATAC-seqピークの分布を示す円グラフである。図12Bは、T<sub>N</sub>に  
対するT<sub>EFF</sub>、T<sub>MEM</sub>、T<sub>EX</sub>、または抗PD-L1 T<sub>EX</sub>の差分(LFC 2上(赤)もしくは下(青))  
または一定または非差分(灰色)領域を比較する円グラフを示す。図12Cは、T<sub>N</sub>細胞  
(LFC 2上または下)と比較した非差次的および差次的ATAC-seqピークの分布を示す。  
示されるデータは、各細胞型の合併された複製に関するものである。

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

20

【図12C】図12Aの説明を参照のこと。

【図13-1】図13A～13Eは、オープンクロマチンの領域の近くの遺伝子の増加し  
た転写が各細胞型に対応することを示す一連の画像である。ATAC-seq分析において同定  
されたOCRに対応する遺伝子セットのGSEAは、図13Aに示すように、T<sub>N</sub>と比較してT<sub>EFF</sub>  
またはT<sub>MEM</sub>において富化され(LFC 2)、または図13Bに示すように、T<sub>EFF</sub>また  
はT<sub>MEM</sub>に比べてT<sub>N</sub>において富化され(LFC 2)、それらは転写開始点(TSS)の20 kb  
以内にある。図13Aおよび図13Bの遺伝子セットの転写を比較するデータは、Doering  
et al. (Doering et al. Immunity 2012, 37:1130-1144)から得られた。図13Cお  
よび13Dは、TSSから20 kb以内にある、(図13C) T<sub>N</sub>と比較した対照もしくは抗PD  
-L1処理T<sub>EX</sub>(LFC 2)における富化、または(図13D) 対照もしくは抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>  
と比較したT<sub>N</sub>(LFC 2)における富化、のATAC-seq分析において同定されたピークに  
対応する遺伝子セットのGSEAを示す。RNA-seqデータを、図13Cおよび図13Dの遺  
伝子セットの転写を比較するのに用いた。図13Eは、T<sub>N</sub>、対照T<sub>EX</sub>、および抗PD-L1処  
理T<sub>EX</sub>におけるCd200r2遺伝子座を示すATAC-seqおよびRNA-seqトラックを示す。1つ  
の代表的な複製からのトラックが示される。

30

【図13-2】図13-1の説明を参照のこと。

【図13-3】図13-1の説明を参照のこと。

【図14】図14は、すべてのATAC-seqオープンクロマチン領域の階層的クラスタリン  
グを示す。実線は、2つの複製を並べて表示して、細胞型間の分離を示す。入力データの  
ユークリッド距離の90ワードクラスタリングのしきい値を平坦化することによって決定さ  
れる列/クラスター。

40

【図15-1】図15A～15Gは、共クラスターのピーク富化を示す一連の画像である  
。図15Aは、図10Iに対応する、図10Hに示される共クラスター分析からの、T<sub>N</sub>  
富化、T<sub>EFF</sub>富化、およびT<sub>MEM</sub>富化グループのオープンクロマチン領域のATAC-  
seq富化(log 2)を示す。各複製のデータは個別に表示される。図15B～図15  
Gは、T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、またはT<sub>MEM</sub>において富化された遺伝子座の代表的なトラックを示す。  
赤いボックスは、指定されたグループおよび後続のグループの間の示差的ピークを示す。  
1つの代表的な複製からのトラックが表示される。

【図15-2】図15-1の説明を参照のこと。

【図15-3】図15-1の説明を参照のこと。

50

【図15-4】図15-1の説明を参照のこと。

【図16-1】図16A～16Iは、代表的なATAC-seqトラックを示す一連の画像である。図16Aは、示されるように、対照TEXまたは抗PD-L1処理TEXにおいて富化された、異なる遺伝子座の代表的なトラックを示す。赤いボックスは、指定されたグループ間の示差的ピークを示す。図16Bでは、黒いボックスはTNと比較したTEFF、TMEMおよびTEXで得られた共有ピークを示し、青いボックスはTEFFおよびTMEMと比較したTEXで失われたピークを示す。図16Cでは、黒いボックスはPdcd1遺伝子座(Oestreich et al. J. Immunol. 2008, 181:4832-4839)のBおよびC領域のピークを示し、赤いボックスは以前に同定されていないOCRを示す。図16Bおよび図16Cは、図10Gに描かれているが、ここでは、抗PD-L1処理TEXも含む。1つの代表的な複製からのトラックが表示される。図16Dは、Tbx21 (T-bet)を示す。図16EはCxcr5を示す。図16Fは、Il10を示す。図16GはNlrc3を示す。図16HはCd200rを示す。図16IはAtp8b4を示す。

10

【図16-2】図16-1の説明を参照のこと。

【図16-3】図16-1の説明を参照のこと。

【図16-4】図16-1の説明を参照のこと。

【図16-5】図16-1の説明を参照のこと。

【図17-1】図17A～17Gは、対照-および抗-PD-L1処理TEXについてのエピジェネティックおよび転写プロファイルが、Eomes<sup>hi</sup> PD-1<sup>hi</sup> TEXサブセットの特徴について富化されていることを示す一連の画像である。図17Aは、T-betおよびEomes発現を示すP14細胞にゲートをかけた代表的なフローサイトメトリーのプロットを示す。数字は、親P14集団の各集団の頻度を示す。図17Bは、抗PD-L1処置後の(図17A)に示されるT-bet<sup>hi</sup>およびEomes<sup>hi</sup>サブセットの頻度の定量化を示す。図17Cは、図17Bに示されるマウスにおけるT-betおよびEomesの幾何学的MFIの定量化を示す。データは、グループあたり少なくとも4匹のマウスを用いた3つの独立した実験の代表である。グループ間の対応のないt検定によって決定された有意性を示すアスタリスクは、\*p 0.05、\*\*p 0.01、および\*\*\*p 0.001である。図17Dは、TNと比較したTEXまたはTNに対する抗PD-L1における富化された遺伝子(LFC 2、p 0.05、上位200)を、PD-1<sup>int</sup>(T-bet<sup>hi</sup>)またはPD-1<sup>hi</sup>(Eomes<sup>hi</sup>)細胞の転写プロファイルと比較したGSEAを示す。図17Eは、TNと比較したTEXまたはTNに対する抗PD-L1において富化されたオープンクロマチン領域の近くの遺伝子(LFC 4、p 0.05)を、PD-1<sup>int</sup>またはPD-1<sup>hi</sup>細胞の転写プロファイルと比較するGSEAを示す。GSEA(左)は、(図17F)抗PD-L1と比較したTEX、または(図17G)TEXと比較した抗PD-L1(LFC 2、p 0.05)を、PD-1<sup>int</sup>(T-bet<sup>hi</sup>)またはPD-1<sup>hi</sup>(Eomes<sup>hi</sup>)細胞の転写プロファイルと比較する。右側に示される個々の遺伝子のヒートマップ。Doering et al. (Doering et al. Immunity 2012, 37:1130-1144)から取得したPD-1<sup>int</sup>およびPD-1<sup>hi</sup>細胞についての転写プロファイル。

20

30

【図17-2】図17-1の説明を参照のこと。

【図17-3】図17-1の説明を参照のこと。

【図17-4】図17-1の説明を参照のこと。

【図17-5】図17-1の説明を参照のこと。

【図17-6】図17-1の説明を参照のこと。

40

【図18-1】図18A～18Eは、共クラスターGOタームを示す一連の画像である。図18A～図18Eは、各細胞型からのピークに関連する選択された有意に富化された(p < 0.05)GOタームを示す。REVIGOを用いて同定された1つの細胞型のみに関連付けられた用語が示される(実験例の材料および方法を参照)。各細胞型のGOタームの完全なリストは、Pauken et al. Table S8 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)において見出すことができる。GOタームは、併合した複製で同定した。

【図18-2】図18-1の説明を参照のこと。

【図18-3】図18-1の説明を参照のこと。

【図19A】図19A～19Fは、PD-1経路遮断後の示差的転写因子結合が、TEX

50

再活化中に変化した転写ネットワークに寄与することを示す一連の画像である。図 19 A は、抗 PD-L1 処置後に失われたまたは得られた O C R における転写因子 ( T F ) 結合モチーフの富化を示す。図 19 B は、各細胞型のペアワイズ比較における T F 結合のウェリントンブートストラップ分析を示し、すべての O C R において富化された上位 10 個の T F ( ボックス ) が示される。Pauken et al. Table S10 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)における完全なリスト。図 19 C は、T<sub>EX</sub>におけるNFATc1 および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>におけるNF B-p65についてのTFフットプリントを示す。図 19 D は、抗PD-L1後の転写およびエピジェネティック変化の統合ネットワーク分析を示す。線は、変化した活動があると予測されたTFを、対応する調節された遺伝子に接続する。Pauken et al. Table S11 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)における詳細。図 19 E は、「パートナーレス」のNFATコンストラクトCA-RIT-NFAT1(Martinez, et al. Immunity 2015, 42:265-278)によって有意に誘導された遺伝子と比較した、抗PD-L1処理によって有意に変化した遺伝子のLFCを示す。図 19 F は、T<sub>EFF</sub>、T<sub>EX</sub>、または両方 ( オーバーラップ ) ( 左上 ) において所定の T F モチーフを含む O C R の近くの遺伝子を示すVenn図を示す。TFターゲット遺伝子における差異のパーセンテージは、T<sub>EX</sub>のみ ( 左下 ) と比較したオーバーラップにおける抗PD-L1で変化した ( p 0.05、LFC 0.3 )。抗PD-L1後のTF標的遺伝子における発現におけるLFCの絶対値の合計 ( 右 )。示されているATAC-seqデータは、各条件の複製を組み合わせたものである。

【図 19 B】図 19 A の説明を参照のこと。

【図 19 C】図 19 A の説明を参照のこと。

【図 19 D】図 19 A の説明を参照のこと。

【図 19 E】図 19 A の説明を参照のこと。

【図 19 F】図 19 A の説明を参照のこと。

【図 20】図 20 は、対照処理T<sub>EX</sub>細胞における転写因子フットプリントを示す。転写因子フットプリントは、対照で処理されたT<sub>EX</sub>からのATAC-seqデータを用いて、示される転写因子についてのマージされた複製 ( 実験例の材料および方法を参照 ) で実行された。示される転写因子は、図 19 B のウェリントンブートストラップ分析を用いて同定した。赤い文字は、フットプリンティング分析での結合の証拠がないために、材料および方法において説明される選択基準に基づいて、下流のネットワーク分析から除外された転写因子を示す。

【図 21】図 21 は、抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>細胞における転写因子フットプリントを示す。転写因子フットプリンティングは、抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>からのATAC-seqデータを用いる、示される転写因子についてのマージされた複製 ( 実験例の材料および方法を参照 ) で実行した。示される転写因子は、図 19 B のウェリントンブートストラップ分析を用いて同定した。赤い文字は、フットプリンティング分析において結合の証拠がないために、本明細書の他の場所に記載される選択基準に基づいて、下流のネットワーク分析から除外された転写因子を示す。

【図 22 A】図 22 A ~ 22 B は、抗 PD-L1 処置後の再活化された T<sub>EX</sub> における差次的に発現される遺伝子の調節に関与する予測された転写因子を示す一連の画像である。2週間の抗PD-L1処理後のマイクロアレイによる、図 22 A に示すように上向きに、または図 22 B に示すように下向きに、異なって発現される遺伝子 ( p 0.05、LFC 0.3 ) ( y 軸 ) およびPSCAN分析を使用用いて同定されたこれらの遺伝子 ( x 軸 ) のプロモーター領域に結合すると予測される転写因子。図 19 B ~ 図 19 D において特定された転写因子と共有されるこの分析を用いて同定された転写因子が、各ヒートマップの下に列記される。異なる転写因子に対応する遺伝子の完全なリストは、Pauken et al. Table S12 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)において利用可能である。

【図 22 B】図 22 A の説明を参照のこと。

【図 23 A】図 23 A ~ 23 B は、分析されたコホートの臨床的特徴、応答データ、および免疫データを示す一連の画像である。図 23 A は、分析に含まれるPenn pembro Expanded Access Program ( 左 ) およびMSKCC Keynote-001試験 ( 右 ) から得られた試料

を示す。図23Bは、2.2よりも大きいかまたは小さいKi67の倍率変化によって層別化されたPennコホートにおける分析された患者からの免疫および臨床データを示す（青色、応答者；赤色、非応答者）。

【図23B】図23Aの説明を参照のこと。

【図24-1】図24A～24Fは、抗PD-1療法に応答するCD8 T細胞が疲弊した表現型を示すことを示す一連の画像である。図24Aは、CR、臨床応答者（応答、完全応答+部分応答）を示す。NR、非応答者（安定した疾患+進行性の疾患）。図24Bは、示された時間でのCD8 T細胞におけるKi67発現を示す（ $n=29$ ）。図24Cは、3週間でのKi67+（緑色）およびKi67-（青色）CD8 T細胞における示されたマーカーの発現を示す（ $n=27$ ）。図24Dは、3週間でのPD-1+（赤）およびPD-1-（青）CD8 T細胞におけるKi67発現を示す（ $n=27$ ）。図24Eは、示された時間でのPD-1+（赤）およびPD-1-（青）CD8 T細胞におけるKi67発現を示す（ $n=29$ ）。図24Fは、免疫応答対前処置のピークでのKi67発現の倍率変化を示す。点線は、2.21の倍率変化を示し、これは、健康なドナーにおいて平均プラス3 s.d.である（図24Dを参照）。\* $P=0.05$ 、\*\*\* $P=0.001$ 、\*\*\*\* $P=0.0001$ 、ウィルコクソン・マッチドペア検定。エラーバー、s.d. すべてのパネルのフローサイトメトリーデータは、示された染色の1～4つの独立した技術的複製の代表である。

10

【図24-2】図24-1の説明を参照のこと。

【図24-3】図24-1の説明を参照のこと。

【図24-4】図24-1の説明を参照のこと。

20

【図25-1】図25A～25Fは、黒色腫を有する患者からのCD4+FOXP3-、CD4+FOXP3+およびCD8 T細胞が、健康なドナーと比較してKi67発現を増加させたことを示す一連の画像である。図25Aは、健康なドナーおよび黒色腫患者におけるFOXP3+CD4 T細胞における頻度およびKi67発現を示す。スチューデントt検定。図25Bは、健康なドナーと黒色腫患者との間のCD8 T細胞におけるKi67発現を示す。Mann-Whitney U検定。図25Cは、健康なドナーおよび黒色腫を有する患者におけるPD-1+およびPD-1-CD8 T細胞におけるKi67発現を示す。健康なドナー対患者、Mann-Whitney U検定；メラノーマを有する患者におけるPD-1+対PD-1- CD8 T細胞、ウィルコクソン・マッチドペア検定。図25Dは、FOXP3-CD4 T細胞およびFOXP3+CD4細胞におけるKi67発現を経時的に示す。ウィルコクソン・マッチドペア検定。（図25E）PD1+CD4+FOXP3-T細胞におけるKi67発現対PFSによる腫瘍負荷の散布図。図25Fは、PD1+CD4+FOXP3+細胞におけるKi67発現対PFSによる腫瘍負荷を示す（前処置、 $n=29$ ；処置後、 $n=27$ （図25E～25F））。すべてのパネルについて、\*\* $P=0.01$ 、\*\*\*\* $P=0.0001$ 。エラーバーはs.d.を示す。すべてのパネルのフローサイトメトリーデータは、示された染色の1～4つの独立した技術的複製の代表である。

30

【図25-2】図25-1の説明を参照のこと。

【図25-3】図25-1の説明を参照のこと。

【図25-4】図25-1の説明を参照のこと。

【図26A】図26A～26Dは、健康なドナーにおける抗ヒトIgG4および増殖しているCD8 T細胞を用いる治療の後に検出されたPD-1を示す一連の画像である。図26Aは、健康なドナーPBMCを、抗PD-1クローンEH12 BV421および/またはpembroと、単独で、一緒に、または順次、続いて抗ヒトIgG4-フィコエリトリンとともに、インキュベートしたことを示す。図26Bは、代表的な健康なドナーからのKi67+CD8 T細胞におけるEomes、T-bet、CD45RA、およびCD27発現のプロットを示す。（図26C）メラノーマの患者および健康なドナーにおける、Eomes対T-bet、およびCD45RA対CD27の表現型の比較（メラノーマ、 $n=25$ 、健康なドナー、 $n=10$ ）。\*\* $P=0.01$ 、スチューデントのt検定。図26Dは、健康なドナーにおける3週間にわたるPD-1+CD8 T細胞上のKi67の平均変化倍率を示す（ $n=7$ ）。エラーバーはs.d.を示し、中心線は平均を示し、点線は、2.21の倍数変化を示し、これは平均+3 s.d.に等しい。すべてのパネルのフローサイトメトリーデータは、示された染色の1～2つの独立した技術的複製の代

40

50

表である。

【図 2 6 B】図 2 6 A の説明を参照のこと。

【図 2 6 C】図 2 6 A の説明を参照のこと。

【図 2 6 D】図 2 6 A の説明を参照のこと。

【図 2 7 - 1】図 2 7 A ~ 2 7 C は、K i 6 7 発現に対する抗 C T L A - 4 療法の効果が処置前の時点に限定されることを示す一連の画像である。図 2 7 A は、K i 6 7 を発現する P D - 1 + C D 8 T 細胞のパーセンテージと抗 C T L A - 4 の最後の投与からの月数との相関関係を示す（前処置、 $n = 26$ ；3 週目、 $n = 25$ ）。図 2 7 B は、C D 8 T 細胞における C T L A - 4 のパーセンテージと、抗 C T L A - 4 の最後の投与からの月数との相関を示す（前処置、 $n = 26$ ；3 週目、 $n = 25$ ）。図 2 7 C は、P F S、全生存率（O S）、腫瘍負荷、および K i 6 7 対腫瘍負荷の比率などの臨床パラメーターと、抗 C T L A - 4 の最後の投与からの月数との相関を示す（前処理、 $n = 23$ 、3 週目、 $n = 22$ ）。 $r$  および P 値、ピアソンの相関。

10

【図 2 7 - 2】図 2 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 8 - 1】図 2 8 A ~ 2 8 H は、疲弊表現型の C D 8 T 細胞が抗 P D - 1 療法によって優先的に再活化されることを示す一連の画像である。図 2 8 A は、3 週間での P D - 1 + C T L A - 4 + C D 8 T 細胞におけるマーカー発現を示す（対応のある  $t$  検定； $n = 27$ ）。（図 2 8 B）代表的なプロット。図 2 8 C は、阻害性受容体を発現する C D 8 T 細胞における K i 6 7 発現を示す。バーは差を示す（対応のある  $t$  検定およびウィルコクソン・マッチドペア検定； $n = 27$ ）。図 2 8 D は、階層的にクラスター化された、S P A D E からの、エフェクター、メモリー、および疲弊のノードを示すヒートマップを示す。図 2 8 E は、第 3 週におけるグランザイム B（左）およびパーフォリン（右）の中央値質量強度（median mass intensities：M M I）の S P A D E を示す（ $n = 4$ ）。図 2 8 F は、3 週目の T E F F、T M E M、および T E X 細胞における細胞溶解マーカーの M M I を示す（P D - 1 + C D 8 + でゲート）。図 2 8 G は、経時的な T E X 細胞における細胞溶解マーカーの M M I を示す。G z m A、G z m B および G z m K は、それぞれグランザイム A、B および K を示す。図 2 8 H は、全 C D 8 T 細胞の R N A - s e q を示す（ $n = 3$ ；実験例の下の方の材料および方法を参照）。K i 6 7 の上位 50 の正の相関の遺伝子セット富化分析、および ref. 19（下）からの抗 P D - L 1 処理対対照 T E X 細胞シグネチャにおいて富化された K i 6 7 の正（上）または負（下）の相関関係のリーディングエッジ。NES、正規化された富化スコア。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。エラーバー、s.d.。フローサイトメトリーデータ（図 2 8 A ~ 2 8 C）は、示された染色の 1 ~ 4 つの独立した技術的複製の代表である。図 2 8 D ~ 2 8 H に示されるマスサイトメトリーデータおよび RNA-seq データは、1 つの技術的な複製の代表である。

20

30

【図 2 8 - 2】図 2 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 8 - 3】図 2 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 8 - 4】図 2 8 - 1 の説明を参照のこと。

【図 2 9 - 1】図 2 9 A ~ 2 9 G は、複数の阻害性受容体を有する C D 8 T 細胞および P D - 1 + C X C R 5 + C D 8 T 細胞が抗 P D - 1 療法によって再活化されることを示す一連の画像である。図 2 9 A は、経時的な複数の阻害性受容体を有する C D 8 T 細胞における K i 6 7 発現を示す。第 0 週対第 3 週（ $n = 27$ ）。ウィルコクソン・マッチドペア検定。図 2 9 B は、pembro 処置の間、P D - 1 に対して陽性の C D 8 T 細胞の割合（%）を示す（ $n = 27$ ）。ウィルコクソン・マッチドペア検定。図 2 9 C は、TEMRA およびナイーブ C D 8 T 細胞集団の C D 4 5 R A 対 T C F - 1 へのバックゲーティングを示す（右）。図 2 9 D は、3 週目の血液中の P D - 1 + C X C R 5 + C D 8 T 細胞における T C F - 1 発現を示す（ $n = 11$ ）。対応のある  $t$  検定。図 2 9 E は、P D - 1 + C X C R 5 +（左）および P D - 1 + C T L A - 4 +（右）サブセットにおける E o m e s / T - b e t（赤）および E o m e s / T C F - 1（緑）発現を示す。図 2 9 F は、P D - 1 + C T L A - 4 + および P D - 1 + C X C R 5 + C D 8 T 細胞における K i 6 7 発現の経時変化（左）、ならびに、P D - 1 + C X C R 5 + および P D - 1 + C T L A - 4 + サブセットにおける K i 6 7 の倍率変化（右）を示す（ $n = 11$ ）。ウィルコク

40

50

ソンのマッチドペア検定。図29Gは、経時的なPD-1 + CXCR5 + およびPD-1 + CTLA-4 + サブセットによるIFN $\gamma$  産生を示す。対応のあるt検定。すべてのパネルで、\*P 0.05、\*\*P 0.01、\*\*\*P 0.001、\*\*\*\*P 0.0001。エラーバーはs.d.を示す。CXCR5およびTCF-1染色は、1つの技術的複製の代表である。すべての他のフローサイトメトリーデータは、示された染色の1~4つの独立した技術的複製の代表である。

【図29-2】図29-1の説明を参照のこと。

【図29-3】図29-1の説明を参照のこと。

【図29-4】図29-1の説明を参照のこと。

【図30-1】図30A~30Iは、慣用的な分化状態およびTEX細胞のクラスターが、CyTOFおよび高次元視覚化を用いて同定され得ることを示す一連の画像である。図30A~30Cは、黒色腫を有する患者からの血液サンプルに適用され、CyTOFによって分析されたSPADE分析を示す。図30Aは、CD27（左）およびCCR7（右）のMMIを示すSPADEツリーを示す（4人の患者を表す）。図30Bは、処置前および3週での倍率変化頻度の中央値強度（左）およびKi67発現（中央および右）によって色付けされたSPADEツリーを示す。図30Cは、TEX、T<sub>MEM</sub>、およびT<sub>EFF</sub>サブセットの倍率変化頻度（左）およびKi67のMMI（右）を示す。図30Dは、経時的なPD-1 + CD8 T細胞におけるTEXクラスターの頻度を示す。図30Eは、3週間後のEomes（左）およびCD39（右）のMMIで色分けされたSPADEツリーを示す（n=4）。（図30F）TEX、T<sub>MEM</sub>、およびT<sub>EFF</sub>サブセットのEomes（左）およびCD39（右）のMMI。図30Gは、CyTOFおよびSPADE分析に基づく、経時的なPD-1 + CD8 T細胞におけるTEXクラスター（左）およびT<sub>EFF</sub>クラスター（右）における細胞のパーセンテージを示す。図30Hは、TEXの頻度vs応答によって色付けされた腫瘍負荷を示す。すべてのパネルのマスサイトメトリーデータは、1つの技術的複製の代表である。図30に示すMMIは、arcsinh変換されたデータを表す。図30Iは、「疲弊空間（exhaustion space）」におけるCD8 T細胞分化の次元削減（tSNE）表現を示す。言い換えれば、この次元削減は、伝統的なT細胞系統マーカーと、本明細書に記載されるサイトメトリーパネルで用いられるエピゲノム的に選択されたT細胞疲弊マーカーと、の組み合わせによって表されるCD8 T細胞の不均一性を表す。この景観の背景に基づいて、疲弊したCD8 T細胞を含み得る集団を同定する3つの伝統的な方法は、PD-1+、PD-1+CD127+対PD-1+CD127-およびPD-1+CXCR5+CD8 T細胞が位置する場所を示すことによって示される。これらのデータが示すのは、これらの定義を用いてでさえ、PD-1+、PD-1+CD127+、PD-1+CD127-およびPD-1+CXCR5+サブセット内に含まれる疲弊T細胞集団にかなりの不均一性が存在することである。この不均一性は、本明細書に記載されるエピゲノム的に定義されたサイトメトリーパネルにおける追加のマーカーによってさらに解決される。

【図30-2】図30-1の説明を参照のこと。

【図30-3】図30-1の説明を参照のこと。

【図30-4】図30-1の説明を参照のこと。

【図30-5】図30-1の説明を参照のこと。

【図31-1】図31A~31Dは、CD8 T細胞のRNA-seqが再活化と関連する分子経路を明らかにすることを示す一連の画像である。図31A~31Dは、0、3、9、12週で3人の患者からの全精製CD8 T細胞で行ったRNA-seqを描く。図31Aは、前処置と比較した3週で変化した遺伝子のvolcanoプロットを示す。すべての遺伝子のlog2倍率変化およびそれらのP値を用いて構築されたvolcanoプロット。図31Bは、上位50の差次的に発現された遺伝子を用いて、前処理と比較して3週目に変更された、遺伝子オントロジー分析によって同定された経路を示す（倍率変化 1.5およびP 0.05のすべての遺伝子）。図31Cは、Ki67への相関係数が、相関ネットワークを生成するために使用されたことを示す。Ki67との相関の強さで色分けされたノード（ピアソンr=1（赤）、-1（青））；ノードサイズは接続性の程度を示す。図31Dは、Ki67との上位100個の相関遺伝子を用いる遺伝子オントロジー分析によって同定された経路を示す（

相関係数 0.67および -0.67の正および負の相関遺伝子)。すべてのパネルのRNAシーケンシングデータは、1つの技術的複製の代表である。

【図31-2】図31-1の説明を参照のこと。

【図31-3】図31-1の説明を参照のこと。

【図32-1】図32A~32Fは、応答する末梢血CD8 T細胞集団における腫瘍浸潤性T細胞クローンおよび血液Ki67+CD8 T細胞応答が腫瘍負荷と相関することを示す一連の画像である。図32A~32Cは、CD8 T細胞上のTCR配列決定を示す(実験例の材料および方法、「セルソーティング」を参照)。図32Aは、血液中および腫瘍中の上位10個のクローンの間のクローンの頻度を示す(赤)。灰色の血液または腫瘍のみのクローン(P値;フィッシャーの直接検定)。PBMC、末梢血単核細胞。図32Bは、上位10個の血液クローンの頻度および上位10個の腫瘍浸潤性T細胞クローンと共有される頻度を示す(赤い矢印)。すべての共有されるクローンはHLA-DR+CD38+(栗色)である。図32Cは、上位10個のTILクローンとの、共有されていないものに対する共有されている、血液中の上位100個のクローンの中のHLA-DR+CD38+クローンの割合を示す。図32Dは、高い(上)または低い(下)腫瘍負荷のCTスキャンの例、および血液CD8 T細胞におけるKi67発現を示す。図32Eは、3週目のランダムフォレスト分析による腫瘍負荷と相関する上位39の免疫パラメータを示す(上)。上位5つのパラメータのヒートマップ(下)。図32Fは、示された細胞における腫瘍負荷の、Ki67発現前処理および最大の処理後に対するピアソン相関を示す( $n=25$ 前処理、23処理後)。図32A~32CのTCRシーケンシングデータは、1つの技術的複製の代表である。rおよびP値、ピアソンの相関。

【図32-2】図32-1の説明を参照のこと。

【図32-3】図32-1の説明を参照のこと。

【図32-4】図32-1の説明を参照のこと。

【図33A】図33A~33Fは、HLA-DRおよびCD38の発現が、血液中で同定された腫瘍の上位100個のクローンに見られる応答性Ki67+細胞およびTCRクローンについて富化することを示す一連の画像である。図33Aは、腫瘍の上位100クローンにもある、処置前および処置後に存在するTCRクローンを示す。処置後末梢血中で上位10に入るクローンは赤で強調表示される。患者14~784には利用可能な前処理試料がなく、含まれていない。図33Bは、経時的なKi67+(赤)およびHLA-DR+CD38+(青)であるCD8 T細胞の割合(%)を示す。図33Cは、HLA-DR+CD38+CD8 T細胞およびCD38+HLA-DR+でない(すなわち、CD38-HLA-DR-、CD38+HLA-DR-およびCD38-HLA-DR+)CD8 T細胞におけるKi67発現の代表的なプロットを示す。図33Dは、Ki67+およびKi67-CD8 T細胞におけるHLA-DRおよびCD38発現の代表的なプロットを示す。図33Eは、HLA-DR+CD38+(「DR+38+」)CD8 T細胞サブセットおよびCD38+HLA-DR+ではない細胞におけるEomes対T-betおよびPD-1対CTLA-4の代表的なプロットを示す。図33Fは、Eomes<sup>hi</sup>T-bet<sup>lo</sup>、PD-1、CTLA-4の割合(%)、およびCD8 T細胞での発現を示す( $n=5$ )。すべてのパネルのTCRシーケンシングおよびフローサイトメトリーデータは、1つの技術的な複製の代表である。

【図33B】図33Aの説明を参照のこと。

【図33C】図33Aの説明を参照のこと。

【図33D】図33Aの説明を参照のこと。

【図33E】図33Aの説明を参照のこと。

【図33F】図33Aの説明を参照のこと。

【図34-1】図34A~34Gは、腫瘍負荷の状況でのCD8 T細胞再活化的トラッキングが抗PD-1療法に対する応答を予測することを示す一連の画像である。図34Aは、Ki67(上)の高い( $n=11$ )および低い( $n=14$ )発現、または高い( $n=9$ )および低い( $n=16$ )腫瘍負荷(下)の患者の全生存率を示す。CART分析によるカットポイント(実験例の資料および方法を参照)。図34Bおよび34Cは、反応および臨床的利益による



血漿サイトカインを示す (Mann-Whitney U検定、進行n=8、臨床的利益n=9)。CR、完全な応答；PD、進行性疾患；SD、安定した疾患。(図3 4 D) 腫瘍負荷に対するKi67の高および低比率の客観的応答比率(左)、LOSによる腫瘍負荷対Ki67(ランドマーク全生存)(中央)、および腫瘍負荷比率に対する処置後のKi67によって層別化されたカプラン・マイヤー全生存(右)。フィッシャーの直接検定による客観的応答(Ki67対腫瘍負荷比率：高、n=13、低、n=10)。カプラン・マイヤーデータ(Ki67対腫瘍負荷比率：高、n=13、低、n=12)。図3 4 E ~ 3 4 Gは、Independent Keynote 001 trialを示す。図3 4 E、3 4 Fは、示されたサブセットにおけるKi67を示す(n=18；対応のあるt検定(左)、ウィルコクソン・マッチドペア検定(右))。図3 4 Gは、腫瘍負荷比率に対する高および低Ki67の客観的応答比率(左)、LOSによるKi67対腫瘍負荷(中央)(n=18)、および腫瘍負荷に対する高対低の処置後Ki67発現についてのカプラン・マイヤー全生存(右)。フィッシャーの直接検定による客観的応答(Ki67対腫瘍負荷率：高、n=11、低、n=7)。カプラン・マイヤー全生存率(Ki67対腫瘍負荷の比率：高、n=11、低、n=7)。\*\*\*P 0.001、\*\*\*\*P 0.0001。エラーバー、s.d.。図3 4 B、3 4 Cのサイトカインデータは2つの技術的複製の代表である。図3 4 E ~ 3 4 GのMSKCCフローデータは2つの技術的複製の代表である。

【図3 4 - 2】図3 4 - 1の説明を参照のこと。

【図3 4 - 3】図3 4 - 1の説明を参照のこと。

【図3 4 - 4】図3 4 - 1の説明を参照のこと。

【図3 4 - 5】図3 4 - 1の説明を参照のこと。

【図3 5 - 1】図3 5 A ~ 3 5 Gは、高いKi67対腫瘍負荷比率が、改善された臨床成績と相関すること、および、モデル選択がBRAFおよび乳酸デヒドロゲナーゼがKi67と相関することを同定することを示す一連の画像である。図3 5 Aは、処置後のKi67発現の最大倍率変化対PFSによって層別化された腫瘍負荷の散布図を示す(n=23)。図3 5 Bは、最大の処置後のKi67発現対応答による腫瘍負荷を示す(n=23)。図3 5 Cは、Ki67発現対ランドマークPFSによって層別化された腫瘍負荷比率を示す(治療に入る6週間から始まるPFS)(左；n=23)。1.94のKi67対腫瘍負荷比率により層別化されたカプラン・マイヤー分析(右；Ki67対腫瘍負荷比：高、n=13、低、n=10)；ログランク検定。図3 5 Dは、Baysean Information Criteria(BIC)を示す。これは、Ki67を最もよく予測する複数の回帰モデルの選択のための基準として用いられる(低いBICスコアはより強いモデルを生成する)。図3 5 Eは、BRAF状態によって層別化されたCD8 T細胞(左)および腫瘍負荷(右)におけるKi67発現の割合(%)を示す。すべてのBRAF+患者はBRAF標的化療法で処置されている(n=4、測定不能な腫瘍負荷の患者を除去した後)；Mann-Whitney U検定。(図3 5 F)パーセンテージKi67+対乳酸脱水素酵素(LDH)(左)および腫瘍負荷対LDH(右)の相関関係。ピアソンの相関関係。(図3 5 G)ランドマーク全生存によって層別されたKi67対LDH比率(治療に入る6週間から開始する全生存期間)(左；n=23)。0.065のKi67対LDH比率によって層別化されたカプラン・マイヤー分析(右；Ki67対LDH比率：高、n=18、低、n=5)。ログランク検定。

【図3 5 - 2】図3 5 - 1の説明を参照のこと。

【図3 5 - 3】図3 5 - 1の説明を参照のこと。

【図3 5 - 4】図3 5 - 1の説明を参照のこと。

【図3 5 - 5】図3 5 - 1の説明を参照のこと。

【図3 5 - 6】図3 5 - 1の説明を参照のこと。

【図3 6】図3 6は、腫瘍負荷の状況におけるT細胞再活化が、耐性(赤)および応答(緑)の抗PD-1パターンの免疫生物学をより正確に反映し得ることを示す。

【図3 7 - 1】図3 7 A ~ 3 7 Hは、マウス由来のトランスクリプトーム疲弊シグネチャがいかにしてヒト疲弊に変換されるかを示す。図3 7 Aは、慢性LCMVクローン13感染(T<sub>EX</sub>)のd15およびd30から単離されたウイルス特異的CD8 T細胞において上方制御または下方制御された遺伝子がいかにして急性LCMV Arm感染(GSE41867)から単離されたT<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、T<sub>MEM</sub>と比較されるか、および、正統なT細胞集団と比較して疲弊において

10

20

30

40

50

特に制御される遺伝子を同定するためにモデレートベイズ統計に基づいて規定された疲弊特異的遺伝子を示す。図37Bは、LCMV感染中のT<sub>EX</sub>における疲弊特異的遺伝子を示すトランスクリプトームのデータのヒートマップである。図37Cは、疲弊において上方制御または下方制御されたものとして同定された遺伝子セットが、GSEAを介したLCMV感染におけるT<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、またはT<sub>MEM</sub>と比較したT<sub>EX</sub>の富化について検証されたことを示す。図37Dは、LCMVクローン13感染 (GSE41869; GSE84105) からのT<sub>EX</sub>サブ集団 (PD-1<sup>Hi</sup>対PD-1<sup>Int</sup>、Tim-3+対CXCR5+) からのトランスクリプトームのデータにおける上昇制御された疲弊遺伝子シグネチャの富化を示す。図37Eは、HIV感染 (GSE24081) におけるエリートコントローラー対プログレッサー、または黒色腫患者 (GSE24536) におけるPBMC対TILからのHIV特異的CD8<sup>+</sup>T細胞から単離されたヒトT細胞を示す。FDRおよび正規化された富化スコア (NES) を示す。図37Dおよび図37Eの破線は、NESを駆動するリーディングエッジ遺伝子を示す。図37Fは、T<sub>EX</sub>集団\*の複数のマウスおよびヒトトランスクリプトームのデータセットにおいて上昇制御された疲弊遺伝子シグネチャが分析されたことを示し、各比較についてプロットされたNESを示す。\*\*\*はFDR 0.001、\*\* 0.01、\* 0.05を示す。図37Gは、黒色腫における (上方制御された) 疲弊シグネチャの富化を促進するリーディングエッジ遺伝子を示すヒートマップを示す (PBMC対TIL) (GSE24536)。図37Hは、HCVにおける (上方制御された) 疲弊シグネチャの富化を促進するリーディングエッジ遺伝子を示すヒートマップを示す (CD39<sup>+</sup>対CD39<sup>-</sup>細胞) (GSE72752)。

【図37-2】図37-1の説明を参照のこと。

【図37-3】図37-1の説明を参照のこと。

【図37-4】図37-1の説明を参照のこと。

【図37-5】図37-1の説明を参照のこと。

【図37-6】図37-1の説明を参照のこと。

【図38-1】図38A~38Fは、特定のエピジェネティックなアクセサビリティによって同定、疲弊における特有に調節された遺伝子を示す。LCMV感染 (GSE86797、GSE87646) におけるT<sub>EX</sub>、T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、およびT<sub>MEM</sub>のATAC-seqデータセットにおける関連するエピジェネティックな変化の存在について、図37において同定されたT<sub>EX</sub>において特に調節される遺伝子を分析した。図38Aは、関連するエピジェネティックな変化を伴う転写的に同定された遺伝子の割合を示す比例的Venn図を示す (UP-について疲弊遺伝子の近くのオープンクロマチン領域 (OCR) のアクセシビリティの増加、DOWN-疲弊遺伝子の近くのOCRのアクセシビリティの減少)。図38Bは、GSE86797からのT<sub>EX</sub>、T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>およびT<sub>MEM</sub>と比較する疲弊遺伝子の近くでの増加したOCR (灰色のバーで強調表示) を示す例示的なATAC-seqトラックを示す。Pdcd1、Ctla4、Tigit、Eomes、Ikzf2、Tox、Cd38、Ptger2、Entpd1が示される。図38Cは、T<sub>EX</sub>と他のT細胞トランスクリプトームデータセットとの比較において、関連するOCRの変化、および疲弊遺伝子セット富化 (「リーディングエッジ (leading edge)」) の推進におけるこれらの遺伝子の役割について、疲弊遺伝子が分析されたことを示す。関連するOCRアクセシビリティ変化を伴う遺伝子は、より高いリーディングエッジの関与を示した。\*\*\* p 0.001。図38Dは、疲弊時にアップレギュレートされた遺伝子のバイナリヒートマップとして、関連するOCR変化を伴う疲弊遺伝子についての疲弊シグネチャ遺伝子のリーディングエッジ寄与を示す (列は遺伝子を示し、列は個々のGSEAの比較を示し、赤はリーディングエッジ寄与を示す)。図38Eは、疲弊でダウンレギュレートされた遺伝子のバイナリヒートマップとして、関連するOCR変化を伴う疲弊遺伝子についての疲弊シグネチャ遺伝子のリーディングエッジ寄与を示す (行は遺伝子を示し、列は個々のGSEAの比較を示し、赤はリーディングエッジ寄与を示す)。図38Fは、関連するOCR変化を伴う疲弊特異的遺伝子セットのGOターム分析を示す。最も低いp値を持つ20のGOタームが示される。

【図38-2】図38-1の説明を参照のこと。

【図38-3】図38-1の説明を参照のこと。

【図38-4】図38-1の説明を参照のこと。

【図38-5】図38-1の説明を参照のこと。

【図39-1】図39A~39Fは、疲弊分子発現のマスサイトメトリー分析を示す。図39Aは、図37A~37Hおよび38A~38Fにおいて規定される疲弊遺伝子セットを、疲弊にフォーカスしたマスサイトメトリーパネルをデザインするのに用いた。CyTOF分析のために選択された遺伝子のリーディングエッジの寄与が示されている。行は遺伝子、列は個々のGSEAの比較を示す。サイトカインおよびケモカインは、専用パネルを用いて刺激設定で分析した。図39Bは、CyTOFのために選択された遺伝子が、図37からの残りの疲弊遺伝子と比較して、 $T_{EX}$  GSEA分析において有意に高いリーディングエッジ寄与を有したことを示す。 $***p < 0.001$ で、単一細胞トランスクリプトームデータにおいて $T_{EX}$ を識別する同様の能力を示した(図44を参照)。図39Cは、PBM C試料( $n = 35$ )からの連結されたCD8 T細胞でのMMI(中央値金属強度)による疲弊マーカー発現を示すヒートマップを示す。 $T_{EX}$ マーカーは、健康な対照ならびにHIVおよび肺癌の患者において正規のCD8 T細胞集団( $T_N$ 、 $T_{CM}$ 、 $T_{EM}$ 、 $T_{EMRA}$ )および全PD-1+CD8 T細胞で分析した。図39Dは、減少したCD4/CD8比がより重篤なHIV感染に関連し、疲弊分子発現と既知の重度の疲弊の設定との間の関連を調査するために用いたことを示す。線形回帰分析は、HIV感染患者と健康なドナーの末梢CD8 T細胞によるマーカー発現について行った。示されるように、試料は陽性率またはMMIでゲートされた。各ドットは、CD4/CD8比に対してプロットされた所定の疲弊マーカーを発現する個々の患者のCD8+T細胞を表す。(48人のHIV患者と健康な対照からの $n=75$ 試料を分析した。より高いサンプル数は、利用可能な場合、縦断的試料を含めるためである。)正の相関は緑、負の相関は赤で示される。同様の結果が、異なるマスサイトメーターでの患者のサブセットでの繰り返し分析で得られた(図45)。図39Eは、これらのデータがペアワイズ法により推定された疲弊マーカー発現の相互相関についてさらに分析したことを示す(図46も参照)。図39Fは、代表的な健康な個体、AIDSに典型的な0.06のCD4/CD8比を示す未治療のHIV患者、および肺癌患者から単離された腫瘍浸潤リンパ球における、PD-1に対してプロットされたCD8 + T細胞上の示された疲弊マーカーの発現を示し、これは、疲弊マーカーの複雑な非線形コンテキスト依存の共発現パターンを強調する。

【図39-2】図39-1の説明を参照のこと。

【図39-3】図39-1の説明を参照のこと。

【図39-4】図39-1の説明を参照のこと。

【図39-5】図39-1の説明を参照のこと。

【図40-1】図40A~40Gは、疲弊マップがHIVおよび肺癌全体の $T_{EX}$ 状態の比較を可能にすることを示す。図40Aは、非ナীব(CD45RA-CCR7-)CD8 T細胞上の16個の疲弊マーカーの発現に関する情報を用いて、48個の試料におけるtSNEベースの次元削減によって生成された疲弊マップを示す。図40Bは、ヒートマップスタイル(マーカー発現の百分率に基づく「炎(flame)」色レベル)に視覚化された疲弊マップ上の(各パネルの左上隅に示される)個々の分子の発現を示す。図40Cは、CD4/CD8比に基づいて様々な重症度の未処置疾患のHIV患者、およびウイルス血症が抑制されたART処置患者について疲弊マップが生成され、健康な対照および肺癌の患者と比較されたことを示す概略図である。図40Dは、次いで、 $T_{EX}$ ランドスケープ上の四量体染色によって同定された真のHIV、FLU、およびCMV特異的CD8 T細胞の位置を決定することによって、疲弊マップが検査されたことを示す。図40Eは、健康な対照ならびにウイルス血症およびART HIV+患者からの総CD8 T細胞も、疲弊ランドスケープにマッピングされたことを示す。図40Fは、同様のフィンガープリントが肺癌患者の試料から単離された細胞に適用されたことを示す：PBM C(左)、肉眼的に関与しない肺組織(中央)または腫瘍浸潤リンパ球(右)。図40Gは、疲弊マップ上の非関与肺からのCD8 T細胞と比較したTILの示差的オーバーレイが、TILに富んだ表現型を強調することを示す。矢印で示されるようにTIL LUクラスターにゲートを設定し、試料ごとに検証した(右)。

10

20

30

40

50

【図 4 0 - 2】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 0 - 3】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 0 - 4】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 0 - 5】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 1 A】図 4 1 A ~ 4 1 G は、高次元クラスタリングが T<sub>EX</sub> 表現型を同定し、HIV 疾患の進行にリンクすることを示す。図 4 1 A は、フェノグラフによる高次元 CD8 T<sub>EX</sub> クラスタ同定および疾患の評価のためのパイプラインの概略図を示す。図 4 1 B は、T<sub>EX</sub> マーカーのフェノグラフ分析が、詳述されるような 48 の試料からのライブ・シングレット CD45+CD3+CD8 T 細胞で実行されたことを示す。正規の CD8 T 細胞集団および総 PD-1+T 細胞は、フェノグラフ分析に基づいてそれらの組成について分析した。コホート内の T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、T<sub>EMRA</sub> および PD-1+CD8 T 細胞内の上位 5 つのフェノグラフクラスターが示される。図 4 1 C は、手動ゲーティングおよび強度分析を用いて、T<sub>EX</sub> 遺伝子および他のマーカーの発現について試験されたフェノグラフクラスターを示す。ヒートマップは、マーカーまたはマーカーの組み合わせのゲート式 (PD-1+CD39+ におけるように (+) または (-) を使用) または中央値金属強度 (TOX など) を示す。行ベースおよび列ベースのクラスタリングは、ピアソンの相関を用いて行った。ヒートマップの色は、示されるように、行の正規化後の z スコアを反映する。図 4 1 D は、抗レトロウイルス療法 (ART) のオンまたはオフでの HIV 特異的 T 細胞のフェノグラフクラスター組成の変化を示す。四量体染色で検出された HIV 患者および健康対照からのウイルス特異的 T 細胞応答へのフェノグラフクラスターの寄与を分析し、上位 5 クラスタが示される (合計 24 の四量体応答が特定された (CMV n=4、FLU n=5、HIV n=15))。図 4 1 E は、フェノグラフクラスターのマッピングされたサイトカイン産生のヒートマップを示す。ウイルス血症の HIV および対照試料、PMA/イオノマイシンで刺激し、クラスターマッピングによってサイトカイン発現について分析した。マッピングは、フェノグラフ分類機能によって実行した。ヒートマップは、マーカーまたはマーカーの組み合わせのゲート式発現、および「STAR 法」セクションにおいて詳述されているように計算された機能的疲弊スコア (FES) を示す。ピアソンの相関メトリックを用いた行ベースのクラスタリングを実行した。列は FES の増加によって配置される。表示される値は行正規化されている。図 4 1 F は、健康な被験者、ならびに処置されたおよび処置されていない HIV 患者 (合計 n=25) におけるフェノグラフクラスターの分布を示し、ここで、異なる病状 (ウイルス血症の CD4/CD8 比、「重度」: 0.2、「中間」: 0.2~0.5、「軽度」: 0.5) を積み重なった棒グラフとして示し、色はクラスター割り当てを反映する。各患者集団内の各クラスターの平均頻度は、対応するバーのサイズで示される。図 4 1 G は、ウイルス血症の HIV 患者における HIV 疾患の進行の主要パラメーター (すなわち、CD4/CD8 比およびウイルス負荷) との、各フェノグラフのクラスター頻度の相関をプロットし、疲弊に関連する疾患パラメーターにリンクされたクラスターを強調するプロットを示す (左上のパネル)。この座標系は、健康者、未治療の HIV 患者、および ART 療法を受けている患者における各クラスターの相対頻度を示す (残りのパネル)。各クラスターのドットサイズはその相対的な存在量に線形に対応し、色は FES に対応する。

【図 4 1 B】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 1 C】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 1 D】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 1 E】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 1 F】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 1 G】図 4 1 A の説明を参照のこと。

【図 4 2 - 1】図 4 2 A ~ 4 2 F は、表現型的および転写的に別個の機能的に疲弊した高次元クラスターが HIV 患者において負荷され、HIV の進行と異なって関連していることを示す。図 4 2 A は、機能的疲弊スコア (FES) が、インビトロで分化した T<sub>EFF</sub> (全 PBMC、またはソートされた T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、もしくは T<sub>EMRA</sub> から生成され、CD3/CD28 ビーズ刺激および IL-2 を用いて活性化された T<sub>EFF</sub>) について計算され、図 4 1 E に示すヒート

マップのようにフェノグラフィクラスターのサイトカイン発現プロファイルと比較された、ヒートマップを示す。FESが高いフェノグラフィクラスターに加えて、 $T_{CM}$ および $T_{EMRA}$ が富化されたクラスターc7およびc10が比較のために表示される。図4-2Bは、図4-6で概説され、FESによって色付けされた疲弊マーカー発現を用いたtSNE分析に基づいてフェノグラフィクラスターがプロットされたグラフであり、高次元表現型および機能的疲弊の一致を示す。図4-2Cは、FESと比較してクラスターが転写因子発現について分析されたことを示すヒートマップである。ヒートマップは、ピアソンの相関を用いて列ごとにクラスター化される。行はFESに基づいて配置される。ヒートマップのカラーリングは、示されるように、列の正規化後のzスコアを反映する。図4-2Dは、(図4-1Gのように)CD4/CD8およびHIV疾患の進行を示すウイルス負荷とのクラスターの頻度の相関に対してプロットされた高いFESを持つ $T_{EX}$ クラスターを示す。図4-2Eは、健康な対象およびHIV患者からのPBMCにおいて同定されたウイルス特異的T細胞を、分析した最も高いFESで上位2(上部のグラフ)および上位9(中央のグラフ)のクラスターの有病率について分析した(上位2および上位9のクラスターについてのパーセンテージの合計が表示される)。さらに、 $T_{EX}$ 比(下のグラフ)は、図4-2Dのように、疾患関連 $T_{EX}$ (DAT;重度のHIVにリンク)と定義されたクラスターの合計を、健康関連 $T_{EX}$ (HAT;軽度のHIVにリンク)と定義されたクラスターの合計で割ったものとして示される。図4-2Fは、図4-2Eと同様に、健康な対象およびHIV患者のPBMCからのCD8+T細胞について決定され、HIV病期によって表示されたトップ2、トップ9および $T_{EX}$ 比を示す。

10

【図4-2-2】図4-2-1の説明を参照のこと。

20

【図4-2-3】図4-2-1の説明を参照のこと。

【図4-2-4】図4-2-1の説明を参照のこと。

【図4-3-1】図4-3A~4-3Gは、肺癌における $T_{IL}$ 機能不全が、重度のHIVおよび組織関連の特徴と共有される $T_{EX}$ 表現型に関連していることを示す。図4-3Aは、7人の肺癌患者におけるフェノグラフィクラスターの分布が、末梢血、非関与肺組織および腫瘍微小環境において分析され、図4-1A~4-1Gに類似した健康な対照と比較されたことを示す。各患者集団における各クラスターの平均頻度は、対応するバーのサイズで示される。図4-3Bは、高および低 $T_{IL}$ 機能性腫瘍のプロットを示す。腫瘍は、一晚の抗CD3+抗CD28刺激後のCD8-TIL IFN- $\gamma$ 産生に基づいて評価され、高および低 $T_{IL}$ 機能性腫瘍に層別化された。図4-3Cは、各フェノグラフィクラスターの相対頻度を示し、これは、図4-2Bおよび図5-8と同じ疲弊座標系で示される。ドットサイズは相対存在量に直線的に対応し、色はFESに対応する。図4-3Dは、トップ2およびトップ9の $T_{EX}$ クラスターの頻度の合計および $T_{EX}$ 比が、図4-2のHIVコホートにおいて規定されるように決定され、末梢血、影響を受けていない肺、および肺癌患者のTILにおいて $T_{EX}$ を分析するのに用いたことを示す。図4-3Eは、低または高機能TILにおいて過剰に表現されたフェノグラフィクラスターを示す(積み重ねバー分析については、図4-7を参照)。\*は $p < 0.05$ を示す。c8:  $p=0.07$ ; c29:  $p=0.08$ 。図4-3Fは、腫瘍機能性に示差的に関連するクラスターについての疲弊、活性化、組織レジデンスおよび転写プログラミングのマーカーの発現を示す二変量プロットを示す。プロットは、フェノグラフィのクラスターリングによって割り当てられた、肺癌患者および健康な対象からの連結されたCD8+T細胞データを表示する。図4-3Gは、肺癌コホートで決定された、軽度または重度のHIVに関連するHATまたはDATクラスターの頻度の合計を示す。TILデータは、図4-3Bに示すように、総集計データとしても、高および低機能性試料の分離としても分析された。DATクラスターは、肺癌の機能不全の腫瘍微小環境において富化する。

30

40

【図4-3-2】図4-3-1の説明を参照のこと。

【図4-3-3】図4-3-1の説明を参照のこと。

【図4-3-4】図4-3-1の説明を参照のこと。

【図4-3-5】図4-3-1の説明を参照のこと。

【図4-4】図4-4は、腫瘍微小環境(TME)からの単一細胞(sc)トランスクリプトームデータにおける $T_{EX}$ 遺伝子のエピゲノム的に選択されたCyTOFパネルサブセットの評価を

50

示す。ヒト黒色腫からのCD8単一細胞RNA-seqデータは、GSE72056 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72056)) から抽出され、tSNE分析によって2Dに配置された。次に、単一細胞データの遺伝子セット変動分析 (GSVA) を、完全にエピゲノム的およびトランスクリプトーム的に定義された疲弊遺伝子リストまたは後にCyTOFによって分析された遺伝子のサブセットを用いて実行した。次に、UPおよびDOWN制御された遺伝子リストを用いたGSVA分析の結果が各細胞について減算され (GSVA\_score\_UP - GSVA\_score\_DN)、tSNE表現にヒートマップ形式で表示され、単一細胞TILデータにおける疲弊シグネチャの強度の相対的推定値を得た (左と中央のパネル)。右側のパネルでは、Tirosh et al. (2016) Science 352:189-196によって報告されるように、個々の患者についてCD8 TIL単一細胞データが表示される。

10

【図45】図45は、図39Dにおいて分析された同じ時点からの15人の患者のPBMC試料を結果の再現性についてテストし、染色し、そして異なるマスサイトメーター (Fluidigm Heliosシステム) で取得したことを示す。患者および健康なドナーにおける末梢CD8 T細胞によるマーカー発現の線形回帰分析を示す。疲弊マーカー発現の陽性について試料にゲートをかけた。各ドットは、その患者のCD4/CD8に対してプロットされた、(MMIの使用が示されている場合を除く) 示されたマーカーを発現するCD8+T細胞の試料/個々の患者あたりの頻度を表す。結果は、Fluidigm CyTOF2で取得された元のデータ (「元の分析」と後で取得された反復コホートデータ (「複製データ」との間で交互に並んでいる。正の相関は緑、負の相関は赤で示される。

【図46A】図46A ~ 46Bは、図39において分析された末梢CD8 T細胞の疲弊マーカー発現が、ヒートマップ図39Eに示されるようにペアワイズ法により推定されたマーカー発現の相互相関についてさらに分析されたことを示す。図46Aは、相互相関データの基礎となるデータの散布図を示す。個々のドットは、個々の患者試料データを表す。図46Bは、p値 (左パネル) およびr値 (右パネル) を示す。データは、図39Eのように、相関値でのクラスタリングによって配置される。(n=75の合計サンプル分析)

20

【図46B】図46Aの説明を参照のこと。

【図47】図47A ~ 47Dは、ウイルス特異的T細胞およびTILの高次元フェノグラフィクラスターの分布を示す。分析されたグループごとのクラスター分布は、図41 ~ 43のように、ウイルス特異的またはTIL CD8 T細胞の割合として示される。図47Aは、血液および肺に由来するFLU特異的CD8 T細胞を比較する。図47Bは、疾患段階または治療状態が示される、HIV特異的CD8 T細胞を示す。図47Cは、IFN- $\gamma$ 機能性に基づいて分割したTIL CD8 T細胞を示す。図47Dは、積み重ねバーグラフ表示における末梢血からのCMV特異的CD8 T細胞を示す。色分けは、右側のパネルで示されるクラスター割り当てを反映する。積み重ねバーの表示には平均値を使用した。

30

【図48】図48A ~ 48Cは、tSNE分析を示す。図48Aは、疲弊マーカーのtSNE分析を用いた、フェノグラフィで規定された疲弊クラスターの2D疲弊マップの生成の概略図を示す。異なるクラスター量に基づくtSNE分布バイアスを回避するために、各フェノグラフィクラスターから同数の細胞 (n=50) をサンプリングした。図48Bは、入力として疲弊マーカーを用いてそれぞれのクラスターからサンプリングされた細胞について計算されたtSNE座標を示し、ドットプロット (左) と等高線プロット (右) で示される。右側のカラーパネルは、クラスターの割り当てを示す。図48Cは、図48Bにあるような疲弊クラスターについての中央疲弊マップ位置のtSNE座標を示し、これらは、図42Bおよび43Cにおいて用いられるようなフェノグラフィクラスターの表現型の関係の簡略化された観点を表示するために得て用いた。

40

【図49】図49A ~ 49Bは、HIV患者および健康な対象からのCD8+T細胞が、図41にしたがって高FESのクラスターの存在量について分析したことを示す。図49Aは、高FESの9のクラスター (c1、c2、c3、c4、c5、c9、c16、c27、c29) のBox and Whiskersディスプレイを示し、これは、未処理の軽度、中程度、重度、およびARTで処理されたHIV感染の患者、ならびに健常者におけるこれらのクラスターの存在量 (CD8の%として表される) を示す (合計n=25)。灰色の水平線は、各パネルのすべてのデータポイント

50

の平均を示す。図 4 9 B は、線形回帰直線でのドットプロットにより示されるような、ART 治療を受けている6人の患者のサブグループが、クラスターの頻度とCD4/CD8比の相関についてさらに分析されたことを示す（疾患重症度との相関についてc1、c2、c3、c4、c29、健康との相関についてc5、c9、c16、c27）。

【図 5 0】図 5 0 は、疾患、健康または治療の予測される臨床結果に関連する異なる細胞型のエピジェネティックな状態の存在または欠如を評価するために試料のハイスループット分析のためのスケールアップをアッセイするための、試料調製からOCRライブラリー生成およびアクセシビリティアッセイまでのエンハンサー-qPCR実験の概略図を示す一連の画像を示す。

【図 5 1】図 5 1 は、さまざまなプライマー対（Tcf7、CD8、およびPD1）についての線形回帰（上段）およびPCR効率（下段）を示す一連のグラフを表し（表 6）、ATAC転移および増幅から生成されたDNAのqPCR分析のアッセイ性能と信頼性を示す。表示されるデータは複数の試料の代表である。

【図 5 2 A】図 5 2 A ~ 5 2 B は、異なる細胞型にわたる様々な代表的な遺伝子座での示差的なクロマチン接近性を示す一連のグラフを示す。図 5 2 A は、Tcf7遺伝子座（左）、CD8遺伝子座（中央）、および疲弊特異的な約-23kb PD1遺伝子座（右）における異なるCD8 T細胞サブ集団（ナイーブ、エフェクター、メモリー、疲弊、および抗PDL1処理疲弊）およびEL4細胞（下2列）についてのATAC-seqトラックを示す。図 5 2 B は、Tcf7遺伝子座（上）、CD8遺伝子座（中央）、および疲弊特異的な-23kb PD1遺伝子座（下）におけるさまざまな細胞濃度でのナイーブCD8、ナイーブCD4、およびEL4細胞からの生Ct（サイクルしきい値）値の要約データを示す。上列のTcf7遺伝子座には、2つの異なるプライマーセット（Tcf7 1およびTcf7 2）を用いた（表 6）。CD8（左）およびCD4（中央）T細胞でオープンであるが、EL4（右）でオープンでない必要がある。10Kおよび50Kでのより低いCt値は、アッセイにおける強力なシグナルを示す。中段のCD8遺伝子座には、2つの異なるプライマーセット（CD8 1およびCD8 2）を用いた（表 6）。CD8（左）はオープンで、CD4（中央）T細胞またはEL4（右）ではそうではない必要がある。10Kおよび50Kでのより低いCt値は、アッセイにおける強力なシグナルを示す。

【図 5 2 B】図 5 2 A の説明を参照のこと。

【図 5 3】図 5 3 は、2つの陽性対照遺伝子座（Cd3gammaプロモーターおよびCd3epsilon 3'非翻訳領域（UTR））および2つの陰性対照遺伝子座（Tinagl1およびCol1alpha2）におけるナイーブCD8 T細胞における相対的なクロマチンアクセシビリティを示す生のCt値の概略データを示す一連のグラフを示す。さまざまな細胞濃度および増幅サイクル数をテストして、アッセイ性能を最適化した。

【図 5 4】図 5 4 A ~ 5 4 B は、ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間の様々な代表的な対照遺伝子座における差次的なクロマチン接近性を示す一連のグラフを示す。図 5 4 A は、CD3gammaプロモーターおよびCD3epsilon 3'UTRにおける陽性対照遺伝子座における、異なるCD8 T細胞サブ集団（ナイーブ、エフェクター、メモリー、疲弊（NT-1およびNT-2）、および抗PDL1処理疲弊）ならびにEL4細胞（下2つ）についてのATAC-seqトラックによる既知のクロマチンアクセシビリティを示す。図 5 4 B は、2つの陽性対照遺伝子座（Cd3gammaプロモーターおよびCd3epsilon 3'UTR）ならびに1つの陰性対照遺伝子座（Col1alpha2）におけるさまざまな細胞濃度でナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞から生成された生Ct値の要約データを示す。

【図 5 5】図 5 5 A ~ 5 5 B は、ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間の様々なエフェクター特異的な遺伝子座における示差的なクロマチンアクセシビリティを示す一連のグラフを示す。図 5 5 A は、インターフェロングamma（IFNg）およびインターロイキン2受容体アルファ（IL-2Ra）遺伝子座における、異なるCD8 T細胞サブ集団（ナイーブ、エフェクター、メモリー、疲弊（NT-1およびNT-2）、および抗PDL1処理疲弊）ならびにEL4細胞（下2行）についてのATAC-seqトラックによる既知のクロマチンアクセシビリティを示す。図 5 5 B は、生のCt値（左の列）、ならびに様々な細胞濃度でのナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間の計算および正規化されたアクセシビリティ倍率変化（

10

20

30

40

50

右の列)の要約データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

詳細な説明

定義

別段の定義がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されものと類似または同等の任意の方法および材料を本発明の試験のための実施に用いることができるが、好ましい材料および方法が本明細書に記載される。本発明の説明および請求において、以下の用語が使用される。

10

【0027】

また、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図していないことも理解されたい。

【0028】

冠詞「a」および「an」は、冠詞の文法上の目的語の1つまたは1つを超える（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。例として、「1つの要素」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

【0029】

本明細書で使用される「約」は、量、時間的な持続時間などの測定可能な値を指す場合、指定された値から、 $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、場合によっては $\pm 5\%$ 、場合によっては $\pm 1\%$ 、場合によっては $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。そのような変動は開示される方法を実行するのに適切であるからである。

20

【0030】

本明細書で使用される「活性化」は、検出可能な細胞の増殖を誘導するのに十分に刺激されているT細胞の状態を指す。活性化は、誘導されたサイトカイン産生、および検出可能なエフェクター機能とも関連し得る。「活性化されたT細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂を起こしているT細胞を指す。

【0031】

可溶性因子の「活性化剤（アクティベーター）」または「アゴニスト」は、可溶性因子のレベルを活性化または増加させることができる剤の分子を指すために本明細書で使

30

【0032】

用される「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然のソースまたは組換えソースに由来するインタクトな免疫グロブリンであり得、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。抗体はしばしば免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、たとえば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む、様々な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

40

【0033】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部を指し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片、線状抗体、scFv抗体、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれるが、これら

50



に限定されない。

【 0 0 3 4 】

本明細書で別段の指定がない限り、「抗体」および「(複数の)抗体」という用語は、広く、自然発生形態の抗体(たとえば、IgG、IgA、IgM、IgE)ならびに組換え抗体、たとえば一本鎖抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体ならびに多重特異性抗体、ならびに前述のすべての断片および誘導体を含み、ここで、これらの断片および誘導体は、少なくとも抗原結合部位を有する。抗体の誘導体は、抗体に結合したタンパク質または化学的成分を含み得る。抗体および抗体断片について本明細書に記載される特性は、本明細書に記載されるFc融合タンパク質にも適用される。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、抗体の「抗原結合部分」(または単に「抗体部分」)も含む。本明細書で使用される「抗原結合部分」という用語は、抗原(たとえば、PD-1ポリペプチドまたはそのフラグメント)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行うことができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例には、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片である、Fab断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片である、F(ab')<sub>2</sub>断片、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)、ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)、が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、それらは、組換え法を用いて、VLおよびVH領域の対が一価ポリペプチドを形成している、単一のタンパク質鎖として作成できるように合成リンカーによって結合させることができる(一本鎖Fv(scFv)として知られる; たとえば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; およびOsbourne et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16: 778を参照)。このような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれることを意図する。完全なIgGポリペプチドまたは他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、特定のscFvの任意のVHおよびVL配列を、ヒト免疫グロブリン定常領域のcDNAまたはゲノム配列に連結させることができる。VHおよびVLは、タンパク質化学または組換えDNA技術のいずれかを用いて、免疫グロブリンのFab、Fvまたはその他の断片の生成にも用いることができる。ダイアボディ(diabodies)などの他の形態の単鎖抗体も含まれる。ダイアボディは、VHドメインおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間でのペアリングには短すぎるリンカーを用いることにより、そのドメインを別の鎖の相補的なドメインとペアにして2つの抗原結合部位を作り出す、2価の二重特異性抗体である。(たとえば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照)。

【 0 0 3 6 】

さらに、抗体またはその抗原結合部分は、1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドとの抗体または抗体部分の共有結合または非共有結合によって形成される、より大きな免疫接着ポリペプチドの部分であってもよい。そのような免疫接着ポリペプチドの例には、四量体scFvポリペプチドを作成するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)、ならびに、二価のビオチン化scFvポリペプチドを作成するためのシステイン残基、マーカーペプチド、およびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)が含まれる。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片などの抗体部分は、抗体全体のそれぞれパインまたはペプシン消化などの慣用的な技術を用いて、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着ポリペプチドは、本明細書に記載されるように、標準的な組換えDNA技術を用いて得ることができる。

## 【 0 0 3 7 】

抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル、異種、同種、もしくは同系、またはその改変形態（たとえば、ヒト化、キメラなど）であり得る。抗体は完全にヒトのものでよい。特定の実施形態において、抗体は、PD-1ポリペプチドまたはその断片に特異的または実質的に特異的に結合し得る。それらはまた、そのような抗原を他のB7ファミリーメンバーなどの密接に関連する抗原から区別することができるように、そのような抗原に対して選択的であってもよい。本明細書で使用する「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位の1つの種のみを含む抗体ポリペプチドの集団を指すが、「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することができる複数の種の抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定の抗原に対して単一の結合親和性を示す。

10

## 【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用される場合、「遮断（ブロックング）」剤または「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の少なくとも1つの生物学的活性を阻害または低減するものである。たとえば、抗PD-1抗体はPD-1に結合し、PD-1が1つまたは複数のリガンド、たとえばPD-L1および/またはPD-L2に結合する能力を阻害する。特定の実施形態では、本明細書に記載の遮断抗体またはアンタゴニスト抗体もしくはその断片は、抗原の所定の生物活性を実質的または完全に阻害する。特定の実施形態では、用語「逆（インバース）アゴニスト」は、通常とは反対の作用を促進する剤を指すために使用される。たとえば、PD-1逆アゴニストは、免疫応答の共阻害とは対照的に、共刺激を促進することができる。

20

## 【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答には、抗体産生、もしくは特定の免疫学的にコンピテントな細胞の活性化、またはそれら両方が含まれる。当業者は、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として役立ち得ることを理解するであろう。さらに、抗原は組換えまたはゲノムDNAに由来し得る。したがって、当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが、その用語が本明細書で使用される「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明が、1を超える遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を含むがこれに限定されないこと、およびこれらのヌクレオチド配列が所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。さらに、当業者は、全く、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要がないことを理解するであろう。抗原は、生成され、合成され、または生物学的試料に由来し得ることは容易に明らかである。そのような生物学的試料は、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または生物学的流体を含み得るが、これらに限定されない。

30

## 【 0 0 4 0 】

「自己抗原」という用語は、本発明によれば、免疫系によって外来性であるかのように認識される任意の自己抗原を意味する。自己抗原は、細胞タンパク質、リンタンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、糖タンパク質、たとえば細胞表面受容体を含むが、これらに限定されない。

40

## 【 0 0 4 1 】

「ATAC-seq」（シーケンシングを用いるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンのアッセイ（Assay for Transposase-Accessible Chromatin））という用語は、クロマチンのアクセシビリティ（接近性）を研究するために分子生物学において用いられる手法である。ATAC-seqは、エピゲノム解析のための迅速かつセンシティブな方法として用いることができる。ATAC-seqは、オープンクロマチン部位を捕捉し、オープンクロマチンのゲノム位置、DNA結合タンパク質、個々のヌクレオソーム、およびヌクレオチドの解像

50

度でのクロマチンコンパクションの間の相互作用を明らかにすることができる。クロマチンは細胞周期中に様々な構造的な変化を起こす。ヒストンタンパク質はクロマチンの基本的なパッカーおよびアレンジャーであり、クロマチンパッキングを変更するためにさまざまな翻訳後修飾によって改変することができる（ヒストン修飾）。改変のほとんどはヒストンのテールで発生する。クロマチンのアクセシビリティおよびコンパクションに関する結果は、たとえば、修飾されるアミノ酸および修飾のタイプに依存する。たとえば、ヒストンのアセチル化は、一般に、複製および転写のためのクロマチンの緩み（loosening）およびアクセシビリティの増加をもたらす。

#### 【0042】

本明細書で使用される「自己免疫疾患」という用語は、自己免疫応答から生じる障害として定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過剰な応答の結果である。自己免疫疾患の例には、これらに限らないが、とりわけ、アディソン病、大脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病（Ⅰ型）、ジストロフィー性表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑症、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が含まれる。自己免疫疾患の例には、これらに限らないが、後天性免疫不全症候群（AIDS、自己免疫構成物を伴うウイルス性疾患）、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アディソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫リンパ増殖性症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、心筋症、セリアックブルー皮膚炎-疱疹状皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIPD）、癰痕性類天疱瘡、冷アグルチニン疾患、CREST症候群、クローン病、デゴス病、皮膚筋炎-若年性、円盤状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋炎、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存型糖尿病、若年性慢性関節炎（スティル病）、若年性関節リウマチ疾患、メニエール病、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺症候群、リウマチ性多発性筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症（進行性全身性硬化症（PSS）、全身性硬化症（SS）としても知られる）、シェーグレン症候群、スティフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑およびウェゲナー肉芽腫が含まれる。

#### 【0043】

本明細書で使用する場合、「自家（自己）」という用語は、後にその個体に再導入される、同じ個体に由来する任意の材料を指すことを意味する。

#### 【0044】

「同種（異系）」は、同じ種の異なる動物に由来する移植片を指す。

#### 【0045】

「異種」は、異なる種の動物に由来する移植片を指す。

#### 【0046】

本明細書で使用する場合、疾患を「緩和する」とは、疾患の1つまたは複数の症状の重症度を軽減することを意味する。

#### 【0047】

「バイオマーカー」または「マーカー」という用語は、T細胞疲弊を示すと決定されている本発明の測定可能な存在物を指す。特定の実施形態では、マーカーまたはバイオマーカーは、疲弊特異的遺伝子を含む。たとえば、本明細書に記載されるバイオマーカーは、T細胞における少なくとも1つの遺伝子の発現を調節するゲノム調節領域であり得る。特定

10

20

30

40

50

の実施形態では、本明細書に記載のバイオマーカーは、T細胞によって発現され、T細胞活性および/またはT細胞疲弊に関連するエフェクター遺伝子またはその産物（たとえば、疲弊したT細胞における高持続性PD-1発現および/または活性）であり得る。バイオマーカーには、これらに限らないが、細胞型（たとえば、操作されたT細胞）、細胞比率（たとえば、操作されたT細胞対疲弊したT細胞の比率）、核酸（たとえば、ゲノム核酸および/または転写された核酸）、およびタンパク質、特に、Pauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)において提供されるものも含まれる。バイオマーカーは、本明細書にさらに記載されるように、対象となる免疫障害を治療するために、望ましくない免疫反応を下方制御する免疫学的標的または剤をさらに含み得る。バイオマーカー活性の調節（たとえば、増加または減少）は、（たとえば、対照、比率、ベースラインとの比較などを用いることを含む、本明細書に記載の測定に従って）任意の数の方法で測定することができる。たとえば、操作された疲弊したCD8+ T細胞において選択的にクロマチンにアクセス可能なゲノム調節領域は、操作されたゲノム調節領域のない同じ生物からの同じT細胞型における少なくとも1つの遺伝子の転写および/または翻訳と比較して、少なくとも1つの遺伝子の遺伝子発現（たとえば、遺伝子転写および/または翻訳）の低下によって測定されるように、少なくとも1つの遺伝子のエンハンサー活性を低下させ得る。遺伝子発現の調節は、経時的に評価することができる。調節は、少なくとも、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%、もしくはそれを超える、またはそれらの間を包括する任意の範囲（たとえば、5%～100%）の変化を意味し得る。

#### 【0048】

本明細書に記載されるバイオマーカーは、そのようなバイオマーカーの任意の個々または組み合わせに関して、本明細書に記載される特徴の任意の組み合わせを示すために用いられ得ることに留意されたい。たとえば、生物にわたるオルソログ、配列組成、同一性パーセント、配列長、ドメイン構造、機能的活性、突然変異状態などの任意の組み合わせを、本発明のバイオマーカー分子を記述するために用いることができる。

#### 【0049】

「遮断（ブロッキング）」抗体または抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の少なくとも1つの生物学的活性を阻害または低減するものである。特定の実施形態では、本明細書に記載の遮断抗体もしくはアンタゴニスト抗体またはそれらの断片は、抗原の所与の生物活性を実質的または完全に阻害する。

#### 【0050】

「二重特異性抗体」または「多重特異性抗体」という用語は、1を超えるエピトープを認識する抗体を指す。そのような抗体は、同じ剤を用いて異なるタンパク質を標的とするのに有用である。そのような抗体を作製する方法は、当技術分野でよく知られている（少なくとも米国特許第5,798,229号；米国特許第5,989,830号；およびHolliger et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1126-1136を参照）。

#### 【0051】

「対照（コントロール）」という用語は、試験試料中の調節および/または発現産物との比較を供するのに適した任意の参照標準を指す。効率のために、発現産物が記載されているが、その説明は発現産物を調節する要素に等しく適用される。一実施形態では、対照は、発現産物レベルが検出され、試験試料からの発現産物レベルと比較される「対照試料」を得ることを含む。そのような対照試料は、これらに限定されないが、既知の結果を伴う対照免疫障害患者からの試料（保存された試料または以前の試料測定物であり得る）、正常な患者または免疫障害患者などの対象から単離された正常な組織または細胞、正常な対象または免疫障害患者などの対象から単離された培養された初代細胞/組織、免疫障害患者の同じ臓器または体の場所から得られた隣接する正常な細胞/組織、正常な対象から

単離された組織または細胞の試料、または寄託機関から得られた初代細胞／組織、を含む任意の適切な試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、これらに限らないが、ハウスキーピング遺伝子、正常組織からの発現産物レベル範囲（または他の以前に分析された対照試料）、患者のグループまたは特定の結果（たとえば、1、2、3、4年の生存など）を有するかまたは特定の治療（たとえば、ケア免疫障害治療の標準）を受けている患者のセットからの試験試料内の以前に決定された発現産物レベル範囲、を含む任意の適切なソースからの参照標準発現産物レベルを含み得る。そのような対照試料および参照標準発現産物レベルは、本発明の方法において対照として組み合わせる用いることができることは、当業者には理解されよう。一実施形態では、対照は、正常または非免疫障害細胞／組織試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、免疫障害患者のセットなどの患者のセット、または特定の治療を受けている免疫障害患者のセット、または1つの結果対別の結果を伴う患者のセット、のための発現レベルを含み得る。前者の場合、各患者の特定の発現産物レベルは、発現の百分位のレベルに割り当てるか、または、参照標準発現レベルの平均またはアベレージよりも高いまたは低いとして表現することができる。別の好ましい実施形態では、対照は、正常細胞、併用化学療法で処置された患者からの細胞、および対象の治療に応答した免疫障害を有する患者からの細胞を含み得る。別の実施形態では、対照はまた、測定値、たとえば、同じ集団におけるハウスキーピング遺伝子の発現のレベルと比較した、集団における特定の遺伝子の発現の平均レベルも含み得る。そのような集団は、正常な対象、いかなる処置も受けていない（すなわち、処置ナイブ）免疫障害患者、標準的なケア療法を受けている免疫障害患者、または関心のある治療に応答した免疫障害を有する患者を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、これらに限らないが、試験試料中の2つの細胞型および／または遺伝子の発現産物レベルの比率の決定ならびにそれとの、参照標準における同じ2つの細胞型および／または遺伝子の任意の適切な比率との比較、試験試料中の2つまたはそれを超える細胞型および／または遺伝子の発現産物レベルの決定ならびに任意の適切な対照における発現産物レベルにおける差異の決定、ならびに、試験試料中の2つまたはそれを超える細胞型および／または遺伝子の発現産物レベルの決定、それらの発現の試験試料中のハウスキーピング細胞型および／または遺伝子の発現への正規化、ならびに任意の適切な対照との比較、を含む発現産物レベルの比率変換を含む。特に好ましい実施形態では、対照は、試験試料と同じ系統および／またはタイプである対照試料を含む。別の実施形態では、対照は、免疫障害を有するすべての患者などの患者試料のセット内またはそれに基づいてパーセンタイルとしてグループ化された発現産物レベルを含み得る。一実施形態では、たとえば特定の百分位数と比較してより高いまたはより低いレベルの発現産物が結果を予測するための基礎として用いられる、対照発現産物レベルが確立される。別の好ましい実施形態では、対照発現産物レベルは、既知の結果を有する免疫障害対照患者からの発現産物レベルを用いて確立され、試験試料からの発現産物レベルは、結果を予測するための基礎として対照発現産物レベルと比較される。以下のデータによって示されるように、本発明の方法は、試験試料中の発現産物のレベルを対照と比較する際の特定のカットポイントの使用に限定されない。

#### 【0052】

本明細書で使用する場合、「蠕虫」という用語は、生きている宿主上で生存および摂食する寄生虫を意味する。特定の実施形態では、蠕虫は、条虫、吸虫、または回虫である。条虫（サナダムシ）は、Cestodaクラスの寄生虫である。それは、典型的には、脊椎動物の消化管に生息する。吸虫は、Trematodaクラスの扁形動物である。吸虫はそれらの宿主に病気を引き起こし得る。住血吸虫症は、吸虫によって引き起こされる寄生虫疾患の例である。回虫はNematoda（線虫）門を構成する。一般にヒトに寄生する回虫には、回虫（ascarids）、フィラリア、鉤虫、蟯虫、および鞭虫が含まれる。多くの回虫はそれらの宿主に病気を引き起こす。たとえば、*Trichinella spiralis*種は、病気の旋毛虫症の原因である。

#### 【0053】

本明細書で使用する場合、「原生動物」という用語は、単細胞の真核生物を意味する。

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、原生動物は、アカントアメーバ種 (*Acanthamoeba* spp.)、バラムチア・マンドリラリス (*Balamuthia mandrillaris*)、ブラストシスチス種 (*Blastocystis* spp.)、クリプトスポリジウム種 (*Cryptosporidium* spp.)、二核アメーバ (*Dientamoeba fragilis*)、エントアメーバ・ヒストリチカ (*Entamoeba histolytica*)、ジアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*)、リーシュマニア種 (*Leishmania* spp.)、ネグレリア・フォーレリ (*Naegleria fowleri*)、温帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、二日熱マラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、トキソプラズマ・ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、トリコモナス・ヴァギナリス (*Trichomonas vaginalis*)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*) またはトリパノソーマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*) であり得る。

10

#### 【0054】

本明細書で使用する場合、「免疫チェックポイント」という用語は、CD4+およびCD8+ T細胞の細胞表面上の一群の分子を意味する。これらの分子は、抗腫瘍免疫応答をダウンモジュレートまたは阻害することにより、免疫応答を微調整する。免疫チェックポイントタンパク質は当技術分野でよく知られており、これらに限らないが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR ファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、および A2aR (たとえば、WO 2012/177624を参照)が含まれる。本発明の方法において有用な免疫チェックポイント阻害剤として機能し得る免疫療法剤には、当技術分野で周知の特定のクラスの抗体などのエフェクター機能を有するFc融合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0055】

「抗免疫チェックポイント療法 (治療)」という用語は、免疫チェックポイントの核酸および/またはタンパク質を阻害する剤の使用を指す。1つまたは複数の免疫チェックポイントの阻害は、免疫調節を促進するために阻害シグナル伝達を遮断または中和することができる。免疫チェックポイントを阻害するのに有用な例示的な剤には、免疫チェックポイントタンパク質またはその断片に結合および/またはそれを不活化または阻害することができる、抗体、小分子、ペプチド、ペプチド模倣体、天然リガンド、および天然リガンドの誘導体、ならびに、免疫チェックポイント核酸またはその断片の発現および/または活性をダウンレギュレーションできる、RNA干渉、アンチセンス、核酸アプタマーなどが含まれる。免疫応答を上方制御するための例示的な剤には、タンパク質とその天然受容体との間の相互作用を遮断する1つまたは複数の免疫チェックポイントタンパク質に対する抗体、1つまたは複数の免疫チェックポイントタンパク質の非活性化形態 (たとえば、ドミナントネガティブポリペプチド); 1つまたは複数の免疫チェックポイントタンパク質とその天然受容体との間の相互作用を遮断する小分子またはペプチド、その天然受容体に結合する融合タンパク質 (たとえば、抗体または免疫グロブリンのFc部分に融合した免疫チェックポイント阻害タンパク質の細胞外部分)、免疫チェックポイント核酸の転写または翻訳を遮断する核酸分子などが含まれる。そのような剤は、1つまたは複数の免疫チェックポイントとその天然受容体との間の相互作用を直接遮断して (たとえば、抗体)、抑制性シグナル伝達を防止し、免疫応答を上方制御することができる。あるいは、剤は、1つまたは複数の免疫チェックポイントタンパク質とその天然受容体との間の相互作用を間接的に遮断して、抑制性シグナル伝達を防ぎ、免疫応答を上方制御することができる。たとえば、安定化された細胞外ドメインなどの免疫チェックポイントタンパク質リガンドの可溶性バージョンは、その受容体に結合して、適切なりガンドに結合する受容体の有効濃度を間接的に低下させることができる。一実施形態では、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および/または抗PD-L2抗体は、単独でまたは組み合わせて、免疫チェックポイントを阻害するために用いられる。これらの実施形態は、PD-1経路 (たとえば、抗PD

30

40

50

- 1 経路療法、別名 P D - 1 経路阻害剤療法としても知られる ) などの特定の免疫チェックポイントに対する特定の療法にも適用可能である。

【 0 0 5 6 】

本明細書で使用される「インフルエンザウイルス」という用語は、オルソミクソウイルス ( Orthomyxoviruses ) 科のメンバーである RNA ウイルスを指す。特定の実施形態では、インフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルス A、インフルエンザウイルス B、インフルエンザウイルス C および インフルエンザウイルス D からなる属から選択される。さらなる実施形態では、インフルエンザ A ウイルスは、サブタイプ H1N1、H1N2、H2N2 または H3N2 のものである。さらなる実施形態では、インフルエンザ B ウイルスは、B / Yama gata / 1 6 / 8 8 様系統または B / Victoria / 2 / 8 7 様系統のものである。

10

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される「ポリオーマウイルス」という用語は、ポリオーマウイルス ( Polyomaviridae ) 科のメンバーであるエンベロープのない DNA ウイルスを指す。ポリオーマウイルスは、環状ゲノムを持つ DNA ウイルスである。そのファミリーの特定のメンバーはオンコウイルスであり、腫瘍を引き起こし得る。特定の実施形態では、ポリオーマウイルスは、BK ウイルス ( BKV )、JC ウイルス ( JCV )、KI ポリオーマウイルス ( KIPyV )、WU ウイルス ( WUPyV )、メルケル細胞ポリオーマウイルス ( MCPyV )、ヒトポリオーマウイルス 6 ( HPyV6 )、ヒトポリオーマウイルス 7 ( HPyV7 )、毛髪異形成棘状 ( trichodysplasia spinulosa ) ウイルス ( TSPyV )、ヒトポリオーマウイルス 9 ( HPyV9 )、または MW ウイルス ( MWPyV ) である。

20

【 0 0 5 8 】

「 P D - 1 」は、既知のリガンドとして P D - L 1 および P D - L 2 を有する共阻害受容体として機能する免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーを指す免疫チェックポイント阻害剤である。PD-1 は、アポトーシス細胞死に関与するタンパク質を選択するためのサブトラクションクロニングベースのアプローチを用いて以前に特定された。PD-1 は、PD-L1 に結合する能力に基づく分子の CD28/CTLA-4 ファミリーのメンバーである。CTLA-4 と同様に、PD-1 は抗 CD3 に応答して T 細胞の表面に迅速に誘導される (Agata et al. Int. Immunol. 1996, 8:765)。しかしながら、CTLA-4 とは対照的に、PD-1 は (抗 IgM に応答して) B 細胞の表面にも誘導される。PD-1 は胸腺細胞および骨髄細胞のサブセットにも発現される (Agata et al. (1996) supra; Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773)。

30

【 0 0 5 9 】

代表的なヒト PD-1 バイオマーカーの核酸およびアミノ酸配列は、NM\_005018.2 および NP\_005009.2 の下で GenBank データベースから公開されている (Ishida et al. (1992) 20 EMBO J 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; U.S. Patent 5,698,520 も参照)。PD-1 は、免疫グロブリンスーパーファミリードメインを含む細胞外領域、膜貫通ドメイン、および免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ ( ITIM ) を含む細胞内領域を有する (Ishida et al. EMBO J. 1992, 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; および U.S. Patent 5,698,520)。これらの特徴は、免疫抑制受容体と呼ばれるポリペプチドのより大きなファミリーも規定し、これには、gp49B、PIR-B、およびキラー阻害受容体 ( KIR ) も含まれる (Vivier and Daeron Immunol. Today 1997, 18:286)。これらの受容体のチロシルリン酸化 ITIM モチーフは SH2 ドメイン含有ホスファターゼと相互作用し、阻害シグナルをもたらすとしばしば考えられている。これらの免疫抑制受容体のサブセットは MHC ポリペプチド、たとえば KIR に結合し、CTLA4 は B7-1 および B7-2 に結合する。MHC および B7 遺伝子の間に系統学的関係があることが提唱されている (Henry et al. (1999) Immunol. Today 20(6):285-8)。ヒト以外の生物における PD-1 オルソログの核酸およびポリペプチド配列は周知であり、たとえば、マウス PD-1 ( NM\_008798.2 および NP\_032824.1 )、ラット PD-1 ( NM\_001106927.1 および NP\_001100397.1 )、イヌ PD-1 ( XM\_543338.3 および XP\_543338.3 )、ウシ PD-1 ( NM\_001083506.1 および NP\_001076975.1 )、およびトリ PD-1 ( XM\_422723.

40

50

3およびXP\_422723.2)が含まれる。

【0060】

PD-1ポリペプチドは、阻害シグナルを免疫細胞に伝達してそれにより免疫細胞エフェクター機能を阻害することができる阻害受容体であるか、または、たとえば可溶性の単量体形態で存在する場合、免疫細胞の共刺激を（たとえば、競合阻害により）促進することができる。好ましいPD-1ファミリーメンバーは、PD-1と配列同一性を共有し、そして、1つまたは複数のB7ファミリーメンバー、たとえば、B7-1、B7-2、PD-1リガンド、および/または抗原提示細胞上の他のポリペプチドに結合する。

【0061】

「PD-1活性」という用語は、たとえば、抗原提示細胞上の天然のPD-1リガンドに結合することにより、活性化された免疫細胞において阻害シグナルを調節するPD-1ポリペプチドの能力を含む。PD-1は、CTLA4と同様の方法で免疫細胞に抑制シグナルを送信する。免疫細胞における阻害シグナルの調節は、免疫細胞の増殖および/または免疫細胞によるサイトカイン分泌の調節をもたらす。したがって、「PD-1活性」という用語は、PD-1ポリペプチドがその天然リガンドに結合する能力、免疫細胞の共刺激または阻害シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力を含む。PD-1活性を調節する剤は、当技術分野でよく知られている。代表的な例としては、これらに限らないが、抗体、たとえば、MDX-1106、Merck 3475、およびCT-011が含まれる。MDX-1106-04、ONO-4538 またはBMS-936558としても知られるMDX-1106は、PCT Publ No. WO 2006/121168 および U.S. Pat. No. 8,008,449.に記載される完全ヒトIgG4抗PD-1モノクローナル抗体である。SCH-900475およびペンプロリズマブとしても知られるMerck 3475は、PCT Publ WO 2009/114335; U.S. Pat. No. 8,354,509; およびHamid et al. (2013) New Engl. J. Med. 369:134-144に記載されるヒト化IgG4抗PD-1モノクローナル抗体である。ピジリズマブ(CT-011; CureTech)は、PD-1に結合するヒト化IgG1モノクローナル抗体である。ピジリズマブおよび他のヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、PCT Publ. No. WO 2009/101611に開示される。同様に、AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune)は、PD-1とPD-L1との間の相互作用をブロックするPD-L2 Fc融合可溶性受容体であり、PCT Publ. Nos. WO 2010/027827 および WO 2011/066342に開示される。さらに、多くの他の抗PD-1 Fc融合タンパク質は、U.S. Pat. No. 8,609,089; US Pat. Publ. No. 2010/028330; U.S. Pat. Publ. No. 2012-0114649; および PCT Publ. No. WO 2014/089113に記載されているように、当該分野で公知である。

【0062】

「PD-1リガンド」という用語は、PD-1受容体の結合パートナーを指し、PD-L1 (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027) およびPD-L2 (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261)。少なくとも2つのタイプのヒトPD-1リガンドポリペプチドが存在する。PD-1リガンドタンパク質は、シグナル配列、およびIgVドメイン、IgCドメイン、膜貫通ドメイン、および短い細胞質尾部を含む。PD-L1 (配列データについてはFreeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027を参照) およびPD-L2 (配列データについてはLatchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261を参照)の両方がポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである。PD-L1およびPD-L2の両方は、胎盤、脾臓、リンパ節、胸腺、および心臓において発現される。PD-L2のみは膵臓、肺、および肝臓において発現され、PD-L1のみは胎児の肝臓で発現される。PD-L1の発現はより広いが、両方のPD-1リガンドは活性化された単球および樹状細胞で上方制御される。たとえば、PD-L1は構成的に発現し、マウスの造血細胞(T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞(DC)、骨髄由来のマスト細胞など)および非造血細胞(内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞など)においてより高いレベルにアップレギュレートされ、PD-L2はDC、マクロファージ、骨髄由来マスト細胞において誘導的に発現されることが知られている(Butte et al. (2007) Immunity 27:111を参照)。

【0063】

10

20

30

40

50



PD-1リガンドは、特定の保存された構造的および機能的特徴を有するポリペプチドのファミリーを含む。「ファミリー」という用語は、タンパク質または核酸分子を指すのに使用される場合、本明細書で定義されるように、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列相同性を有する2つまたはそれを超えるタンパク質または核酸分子を意味することを意図する。そのようなファミリーメンバーは、自然発生または非自然発生であり得、そして同じまたは異なる種のいずれかに由来し得る。たとえば、ファミリーは、ヒト起源の最初のタンパク質、ならびに他のヒト起源の別個のタンパク質を含み得るか、あるいは、非ヒト起源のホモログを含み得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特徴も有し得る。PD-1リガンドは、ポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである。本明細書で使用される「B7ファミリー」または「B7ポリペプチド」という用語は、B7ポリペプチドと配列相同性を共有する共刺激ポリペプチド、たとえば、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、誘導性共刺激リガンド (ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、VISTA、B7-H6、B7h (Swallow et al. (1999) *Immunity* 11:423)、および/またはPD-1リガンド (たとえば、PD-L1またはPD-L2) を含む。たとえば、ヒトB7-1およびB7-2は、NCBIでBLASTプログラムをデフォルトのパラメーター (ギャップペナルティがexistence 11 および extension 1に設定されたBlosum 62 matrix) を用いて比較した場合に約26%のアミノ酸配列同一性を共有する (NCBI Webサイトを参照)。用語B7ファミリーには、免疫細胞機能を調節することができるこれらのポリペプチドの変異体も含まれる。B7ファミリーの分子は、シグナルドメイン、IgVドメイン、およびIgCドメインを含む、いくつかの保存された領域を共有する。IgVドメインおよびIgCドメインは、当技術分野で認められたIgスーパーファミリーメンバードメインである。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる別個の折りたたみパターンを有する構造単位に対応する。Igフォールドは、2つのBシートのサンドイッチから構成され、それらはそれぞれが5~10アミノ酸の逆平行Bストランドからなり、IgのすべてではないがほとんどのIgCドメインに2つのシート間の保存されたジスルフィド結合が存在する。TCR、およびMHC分子は、同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内のC1セットと呼ばれる。他のIgCドメインは他のセット内にある。IgVドメインも配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインはIgCドメインより長く、Bストランドの追加のペアを含む。

【0064】

「免疫障害」という用語は、望ましくない免疫応答を特徴とする状態を指す。特定の実施形態では、免疫障害は、所望の抗免疫障害応答が免疫応答を抑制するようなものである。免疫応答のダウンレギュレーションが望まれるそのような状態は当技術分野で周知であり、これらに限らないが、本明細書にさらに記載されるように、組織、皮膚および臓器移植の状態、移植片対宿主病 (GVHD)、炎症、または自己免疫疾患、たとえば、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、アレルギー、過敏症反応、改良されたワクチン接種効率を必要とする障害、および増加した調節性T細胞産生または機能を必要とする障害が含まれる。他の実施形態では、免疫障害は、所望の応答が増加した免疫応答であるようなものである。免疫応答のアップレギュレーションが望まれるそのような状態は当技術分野で周知であり、これらに限定されないが、癌、感染症 (たとえば、寄生体、細菌、蠕虫、またはウイルス感染症) などと戦うような増加されたCD4+エフェクターT細胞集団または機能を必要とする障害が含まれる。

【0065】

「急性免疫障害」という用語は、標的化抗原およびそのような標的化抗原を含む宿主、たとえば、癌、またはウイルス、細菌、寄生体、マイコプラズマ、真菌などの感染因子を根絶する適切な免疫応答によって解決することができる状態を指す。このような状態は比較的短く、数日から数週間程度続く。

【0066】

対照的に、「慢性免疫障害」という用語は、ホストの免疫応答の誘導によって効果的に解消または排除されないこれらの状態を指す。慢性免疫障害では、対象が必ずしも症状を

10

20

30

40

50

発現することなく、長期間（すなわち、数ヶ月から数年、または一生の期間）にわたって標的抗原または標的抗原を含むホスト（たとえば、感染性または癌に罹患したままであるもの）を維持するように、感染因子または癌細胞などの標的化抗原（および／または標的化抗原を含む宿主）、および免疫応答が平衡に達する。慢性免疫障害は、宿主細胞の急速な死滅または過剰な損傷さえも引き起こさずに、サイレントかつ生産的な標的抗原維持の段階を伴い得る。標的化抗原または標的化抗原を含むホストの検出は、当技術分野でよく知られている多くの方法によって行うことができ、たとえば、米国特許第6,368,832号、第6,579,854号、および第6,808,710号、ならびに米国特許出願公開番号20040137577、20030232323、20030166531、20030064380、20030044768、20030039653、20020164600、20020160000、20020110836、20020107363、および 200201067に記載されている。

10

#### 【0067】

特定の実施形態において、慢性免疫障害は、これらに限らないが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、T細胞白血病ウイルス、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、麻疹、パポーパウイルス、プリオン、肝炎ウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、パピローマウイルス、プリオンなどを含む、ウイルスによる感染などの感染の結果である。特定の実施形態では、慢性免疫障害は、これらに限らないが、B型肝炎ウイルス、ノロウイルス、および／またはアネロウイルスを含む、ウイルスによる感染などの感染の結果である。特定の実施形態では、慢性免疫障害は、これらに限らないが、マラリア、結核菌（*mycobacterium tuberculosis*）、トリパナソーマ・クルジ（*trypanosoma cruzi*）、トキソプラズマ原虫（*toxoplasma gondii*）、および／または森林型熱帯リーシュマニアを含む、非ウイルス性慢性感染症での感染の結果である。慢性免疫障害には、たとえば、慢性状態および潜伏状態が含まれる。本明細書中で使用される場合、慢性免疫障害は、慢性状態、潜伏状態、またはその両方に限定され得る。

20

#### 【0068】

「慢性状態」では、長期間であっても、疾患の徴候および症状の有無にかかわらず、いつでも対象において標的抗原を検出することができる。感染に起因する慢性状態の非限定的な例には、B型肝炎（B型肝炎ウイルス（HBV）が原因）および肝炎（C型肝炎ウイルス（HCV）が原因）アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、ヒトヘルペスウイルス6、水痘帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、パルボウイルスB19、ポリオーマウイルスBK、ポリオーマウイルスJC、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトT細胞白血病ウイルスI、およびヒトT細胞白血病ウイルスIIが含まれる。寄生性持続感染は、たとえば、リーシュマニア（*Leishmania*）、トキソプラズマ（*Toxoplasma*）、トリパノソーマ（*Trypanosoma*）、プラスモジウム（*Plasmodium*）、シストソーマ（*Schistosoma*）、エンセファリトゾーン（*Encephalitozoon*）、ノロウイルス、アネロウイルス、マイコバクテリウム種、マラリア種、マラリア、結核菌、トリパナソーマ・クルジ、トキソプラズマ原虫、および／または森林型熱帯リーシュマニアによる感染の結果として起こり得る。

30

40

#### 【0069】

感染症を含む特定のタイプの慢性状態は、感染因子（ウイルスなど）が、対象が常に兆候や症状を示すわけではないように、不活性で休止状態に見える、「潜伏状態」として知られる。潜伏的なウイルス感染では、ウイルスは症状が再び現れる前に長期間、ホストと平衡状態を保つが、実際のウイルスは、典型的には、疾患の再活性化が起こるまで検出することができない。感染潜伏期は、ウイルスなどの病原性感染因子が細胞内で休眠する能力である。たとえば、潜伏的ウイルス感染は、最初の感染後にウイルス産生が停止する、特定のウイルスのライフサイクルにおけるフェーズである。しかしながら、ウイルスゲノムは完全に根絶されていない。この結果、ホストは新しいウイルスに感染することなく、ウイルスが再活性化し、大量のウイルスの子孫の生成を開始することができる（ウイルス

50

のライフサイクルの溶菌部分)。ウイルスは無期限に宿主内に留まり得る。一実施形態では、ウイルス潜伏期は、ウイルスが潜伏期間を経ているが休止状態ではない臨床潜伏期と同一ではない。潜伏感染の非限定的な例には、単純ヘルペスウイルス(HSV)-1(発熱性水疱)、HSV-2(性器ヘルペス)、および水痘帯状疱疹ウイルスVZV(水痘帯状疱疹)による感染が含まれる。

【0070】

本明細書で使用する場合、「免疫療法(治療)剤」という用語は、対象において免疫調節を促進するために宿主免疫系を刺激することができる任意の分子、ペプチド、抗体または他の剤を含み得る。様々な免疫療法剤が、本明細書に記載される組成物および方法において有用である。

10

【0071】

「阻害」または「逆転」という用語は、たとえば、特定の作用、機能、または相互作用の減少、制限、または遮断を含む。特定の実施形態では、免疫障害の少なくとも1つの症状が緩和、終了、減速、または防止される場合に、免疫障害は「阻害」または「逆転」される。本明細書で使用される場合、免疫障害の再発または拡大が低減、減速、遅延、または防止される場合に、免疫障害も「阻害」または「逆転」される。

【0072】

「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まないものであり得る。

20

【0073】

「単離されたタンパク質」とは、細胞から単離された場合もしくは組換えDNA技術によって生成された場合、他のタンパク質、細胞材料、分離培地、および培養培地、または化学合成された場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まないタンパク質を指す。「単離」または「精製」されたタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、抗体、ポリペプチド、ペプチドまたは融合タンパク質が由来する細胞または組織ソースからの細胞物質または他の汚染タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成された場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という言葉は、そのタンパク質がそれが単離されるかまたは組換えにより産生される細胞の細胞成分から分離されている、バイオマーカーポリペプチドまたはその断片の調製物を含む。一実施形態では、「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、約30%(乾燥重量)未満の非バイオマーカータンパク質(本明細書では「汚染タンパク質」とも呼ばれる)、より好ましくは約20%未満の非バイオマーカータンパク質、さらにより好ましくは約10%未満の非バイオマーカータンパク質、そして最も好ましくは約5%未満の非バイオマーカータンパク質を有する、バイオマーカータンパク質またはそのフラグメントの調製物を含む。抗体、ポリペプチド、ペプチドもしくは融合タンパク質またはその断片、たとえば、その生物学的に活性な断片が組換えにより生成される場合、それはまた好ましくは実質的に培養培地を含まない、すなわち培養培地は、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。

30

【0074】

本明細書中で使用される場合、用語「 $K_d$ 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいうことが意図される。開示された発明の抗体の結合親和性は、標準的な抗体-抗原アッセイ、たとえば競合アッセイ、飽和アッセイ、またはELISAもしくはRIAなどの標準的なイムノアッセイによって測定または決定することができる。

40

【0075】

「がん(癌)」または「腫瘍」または「過剰増殖性疾患」という用語は、制御されない増殖、不死、転移の可能性、急速な成長および増殖速度、ならびに特定の特徴的な形態学的特徴など、がんに起因する細胞に典型的な特徴を有する細胞の存在を指す。がん細胞はしばしば腫瘍の形態であるが、そのような細胞は動物内に単独で存在することもできるし、または白血病細胞などの非腫瘍形成性の癌細胞でもあり得る。がん細胞は、局所的に、

50

または血流およびリンパ系を介して体の他の部分に広がり得る。「がん（癌）」という用語は、前悪性および悪性の癌を含む。本明細書に記載される「前悪性病変」という用語は、癌性ではないが癌性になる可能性がある病変を指す。それはまた、「前悪性疾患」または「潜在的に悪性の疾患」という用語も含まれる。特に、これは、悪性形質転換のリスクが通常よりも高い良性の、形態学的、および/または組織学的に変化した組織、ならびに、局所組織の臨床的外観を必ずしも変化させないが、その組織（白板症、紅斑、扁平苔癬（erythroleukoplakia lichen planus）（苔癬反応））および組織検査で細胞の異型または異形成を示した病変または領域における前癌病変または癌発症の通常より高いリスクに関連する、疾患または患者の性質を指す

【0076】

がんには、これらに限らないが、B細胞癌、たとえば、多発性骨髄腫、ウォルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、たとえば、アルファ鎖疾患、ガンマ鎖疾患、およびミュー鎖疾患、良性単クローン性 グロブリン異常症、および免疫細胞性アミロイドーシス、黒色腫、乳がん、肺がん、気管支がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、胃がん、卵巣がん、膀胱がん、脳または中枢神経系がん、末梢神経系がん、食道がん、子宮頸がん、子宮または子宮内膜がん、口腔がんまたは咽頭がん、肝臓がん、腎臓がん、精巣がん、胆道がん、小腸がんまたは虫垂がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、血液組織のがんなどが含まれる。本発明に包含される方法に適用可能な癌のタイプの他の非限定的な例には、ヒト肉腫および癌腫、たとえば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨形成肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、肝臓癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、骨癌、脳腫瘍、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、たとえば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球）白血病および慢性リンパ性白血病）、および真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ウォルデンストレームマクログロブリン血症、および重鎖疾患が含まれる。特定の実施形態では、癌は本質的に上皮性であり、これらに限らないが、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、婦人科癌、腎癌、喉頭癌、肺癌、口腔癌、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、または皮膚癌が含まれる。他の実施形態では、癌は、乳癌、前立腺癌、肺癌、または結腸癌である。さらに他の実施形態では、上皮癌は、非小細胞肺癌、非乳頭状腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌（たとえば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮癌は、これらに限らないが、漿液性、類内膜性、粘液性、明細胞、ブレナー、または未分化を含む、他の様々な方法で特徴付けられてもよい。

【0077】

「キメラタンパク質」とは、2つのドメインが同じポリペプチドユニット内で自然発生でない、2つの異なるポリペプチドドメインを含む任意の単一のポリペプチドユニットを意味する。典型的には、そのようなキメラタンパク質は、cDNA構築物の発現により作製されるが、当技術分野で既知のタンパク質合成法により作製することができる。

【0078】

本明細書で使用される場合、「併用療法」とは、第1の剤が別の剤と組み合わせて投与されることを意味する。「併せて」は、別の治療モダリティに加えて、1つの治療モダリティの投与を指す。したがって、「併せて」とは、他の治療モダリティを個体に送達する前、間、または後に、一方の治療モダリティを投与することを指す。このような組み合わせは、単一の治療レジメンまたはレジメンの一部であると見なされる。

【0079】

本明細書で使用される場合、「同時投与」という用語は、併用療法における第1の療法

10

20

30

40

50

の投与と第2の療法の投与が互いに重複することを意味する。

【0080】

本明細書で使用される「共刺激リガンド」という用語は、T細胞上の同種の共刺激分子に特異的に結合することにより、たとえば、TCR/CD3複合体とペプチドがロードされたMHC分子との結合によって供される一次シグナルに加えて、これに限定されないが、増殖、活性化、分化などを含む、T細胞応答を媒介する、シグナルを供する、抗原提示細胞（たとえば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上の分子を含む。共刺激リガンドには、これらに限らないが、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンボトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3と特異的に結合するリガンドが含まれ得る。共刺激リガンドはまた、とりわけ、T細胞上に存在する共刺激分子、たとえば、これらに限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンドと特異的に結合する抗体も包含する。

10

【0081】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、これに限定されないが、増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同族の結合パートナーを指す。共刺激分子には、これらに限らないが、ICOS、4-1BB、CD28、CD226、CD27、OX40、CD30、およびLIGHTが含まれる。

20

【0082】

本明細書で使用される「共刺激シグナル」は、TCR/CD3ライゲーションなどの一次シグナルと組み合わせて、T細胞増殖および/または重要分子のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションをもたらすシグナルを指す。

【0083】

「疾患」は、動物がホメオスタシス（恒常性）を維持することができない動物の健康状態であり、疾患が改善されない場合、動物の健康は悪化し続ける。対照的に、動物の「障害」は、動物が恒常性を維持できる健康の状態であるが、障害がない場合よりも動物の健康状態は好ましくありません。治療しないでおくと、障害によって必ずしも動物の健康状態がさらに悪化するわけではない。

30

【0084】

本明細書で使用される「有効量」は、治療的または予防的利益を供する量を意味する。

【0085】

「コード（コーディング）する」とは、規定されたヌクレオチドの配列（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）またはアミノ酸の規定された配列のいずれか、およびそれから生じる生物学的特性を有する生物学的プロセスにおいて他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして機能するための、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド内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、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞また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、その遺伝子は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、通常は配列表に記載されているコード（コーディング）鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のためのテンプレートとして用いられる非コード（非コーディング）鎖と、の両方が、そのタンパク質またはその遺伝子もしくはcDNAの産物をコードするとして言及され得る。

40

【0086】

特に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列にはイントロンが含まれ得る。

【0087】

50

「エピジェネティクス」という用語は、DNA配列を変化させることなく発生する、遺伝子活性および発現の遺伝的变化として定義される。これらの非遺伝的な変更は、2つの主要なエピジェネティックな修飾：DNAのシトシン残基への化学的修飾（DNAメチル化）およびDNAに関連するヒストンタンパク質の化学的修飾（ヒストン修飾）によって厳密に制御されている。エピジェネティクスという用語は、単一の遺伝子または複数の遺伝子を含むセットにおけるそのような変化を指すために交換可能に用いることができる。

【0088】

「エピゲノム」という用語は、細胞の全体的なエピジェネティックな状態を指し、ゲノム全体にわたるエピジェネティックなマーカーのグローバルな分析を反映する。エピジェネティック修飾パターンのマッピングまたは所定の細胞におけるエピゲノムのプロファイリングにより、臨床予測、診断、および治療開発のためのエピジェネティックバイオマーカーを同定することができる。

10

【0089】

本明細書中で使用される場合、用語「エピジェネティック経路」は、細胞の「エピゲノム」またはエピゲノム状態に寄与する任意の構成要素を含む。

【0090】

本明細書で使用される場合、「内因性」とは、生物、細胞、組織、または系からの任意の材料、またはその内部で生産された任意の材料を指す。

【0091】

本明細書で使用する場合、「外因性」という用語は、生物、細胞、組織、もしくは系に導入された任意の材料、または生物、細胞、組織、もしくは系の外部で生産された任意の材料を指す。

20

【0092】

本明細書で使用する「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳として定義される。

【0093】

「発現ベクター」は、発現されるべきヌクレオチド配列に作用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、発現のために十分なシス作用要素を含む。発現のための他の要素は、宿主細胞によって、またはインビトロ発現系において、供給することができる。発現ベクターは、組換えポリヌクレオチドを組み込む、コスミド、プラスミド（たとえば、裸またはリポソームに含まれるもの）およびウイルス（たとえば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）などの当技術分野で知られたすべてのものを含む。

30

【0094】

「相同」とは、2つのポリペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性または配列同一性を指す。2つの比較される配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットで占められている場合、たとえば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンで占められている場合、分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同性の割合（パーセント）は、2つの配列で共有される一致または相同な位置の数を、比較される位置の数で割った数 $\times 100$ の関数である。たとえば、2つの配列間の位置の10のうちの6がマッチまたは相同なら、それら2つの配列は60%相同である。例として、DNA配列A T T G C CおよびT A T G G Cは、50%の相同性を共有する。一般に、比較は、最大の相同性を供するように2つの配列を整列させて行われる。

40

【0095】

本明細書で使用する「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、抗体として機能するタンパク質のクラスとして定義される。B細胞によって発現される抗体は、時々、BCR（B細胞受容体）または抗原受容体と呼ばれる。このクラスのタンパク質に含まれる5つのメンバーは、IgA、IgG、IgM、IgD、およびIgEである。IgAは、唾液、涙、母乳、胃腸分泌物、気道および尿生殖路の粘液分泌物などの体の分泌物中に存在する一次抗体である。IgGは最も一般的な循環抗体である。IgMは、ほとんどの対照において一次免疫応答

50

において産生される主要な免疫グロブリンである。凝集、補体結合、および他の抗体応答において最も効果的な免疫グロブリンであり、細菌およびウイルスに対する防御に重要である。IgDは、既知の抗体機能を持たない免疫グロブリンであるが、抗原受容体として機能し得る。IgEは、アレルゲンへの曝露時にマスト細胞および好塩基球からメディエーターの放出を引き起こすことにより、即時型過敏症を媒介する免疫グロブリンである。

【0096】

本明細書で使用される「免疫反応」という用語は、免疫細胞を刺激および/または活性化した検出可能な結果、たとえばサイトカイン分泌、抗体分泌、細胞溶解活性または抗体依存性細胞毒性(ADCC)を意味する。

【0097】

本明細書で使用される用語「免疫応答」または「免疫学的応答」は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および/または抗原提示細胞のいずれかにおけるエフェクター機能の活性化および/または発動をもたらすプロセスを意味する。したがって、当業者によって理解されるように、免疫応答には、これらに限らないが、ヘルパーT細胞または細胞傷害性T細胞応答の任意の検出可能な抗原特異的または同種異系活性化、抗体の産生、アレルギー反応のT細胞媒介性活性化などが含まれる。本明細書で使用する場合、「免疫応答」という用語は、T細胞媒介および/またはB細胞媒介免疫応答を含む。例示的な免疫応答には、T細胞応答、たとえば、サイトカイン産生および細胞の細胞毒性が含まれる。さらに、免疫応答という用語は、T細胞活性化により間接的に影響を受ける免疫応答、たとえば抗体産生(体液性応答)およびサイトカイン応答性細胞、たとえばマクロファージの活性化を含む。免疫応答に関与する免疫細胞には、リンパ球、たとえば、B細胞およびT細胞(CD4+、CD8+、Th1およびTh2細胞)、抗原提示細胞(たとえば、プロフェッショナル抗原提示細胞、たとえば、樹状細胞、マクロファージ、Bリンパ球、ランゲルハンス細胞、および非プロフェッショナル抗原提示細胞、たとえば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト)、ナチュラルキラー細胞、骨髄細胞、たとえば、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球が含まれる。

【0098】

本明細書で使用される「免疫細胞」は、後天性または先天的な免疫系の生成、制御または効果に関与する任意の細胞を含む。免疫細胞には、CD4+細胞、CD8+細胞、およびさまざまな他のT細胞サブセットなどのT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、および好中球が含まれる。

【0099】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の構成要素が、哺乳動物において病的状態を引き起こすか、媒介するか、そうでなければ寄与する、疾患を意味する。免疫応答の刺激または介入が疾患の進行に改善効果をもたらす疾患も含まれる。この用語には、自己免疫疾患、免疫介在性炎症性疾患、非免疫介在性炎症性疾患、感染性疾患、および免疫不全疾患が含まれる。本発明にしたがって処置することができる、そのいくつかは免疫またはT細胞媒介性である、免疫関連および炎症性疾患の例には、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症性筋症(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症)、自己免疫性血小板減少症(特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症)、甲状腺炎(グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介在性腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)、中枢および末梢神経系の脱髄性疾患、たとえば、多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパチーまたはギランバレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、肝胆道疾患、たとえば、感染性肝炎(肝炎A型、B型、C型、D型、E型およびその他の非肝指向性ウイルス)、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性および線維性肺疾患、たとえば、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)、グルテン過敏性腸症、および

10

20

30

40

50

ホイップル病、自己免疫性または免疫介在性皮膚疾患、たとえば、水疱性皮膚疾患、多形紅斑および接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、たとえば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症およびじんま疹、肺の免疫学的疾患、たとえば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎、移植関連疾患、たとえば、移植片拒絶および移植片対宿主病が含まれる。感染症には、AIDS（HIV感染）、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、細菌感染、真菌感染、原虫感染、寄生体感染が含まれる。

#### 【0100】

「感染性疾患（感染症）」という用語は、細菌、ウイルス、真菌、または寄生体などの病原性（微）生物によって引き起こされる障害を指す。本開示の感染性疾患には、これらに限らないが、細菌、ウイルス、原生動物、マイコプラズマ、真菌、酵母、寄生体、またはプリオンが含まれる。たとえば、限定するものではないが、免疫原は、ヒトパピローマウイルス（下記参照）、ヘルペスウイルス、たとえば、単純ヘルペスまたは帯状疱疹、レトロウイルス、たとえば、ヒト免疫不全ウイルス1または2、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ライノウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、肺炎マイコプラズマ（*Mycoplasma pneumoniae*）、サルモネラ（*Salmonella*）、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）、連鎖球菌（*Streptococcus*）、腸球菌（*Enterococcus*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、エシェリキア（*Escherichia*）、クレブシエラ（*Klebsiella*）、ビブリオ（*Vibrio*）、マイコバクテリウム（*Mycobacterium*）属の細菌、アメーバ、パラモリス、マラリア寄生体、およびトリパノソマ・クルジ（*Trypanosoma cruzi*）であり得る。

#### 【0101】

可溶性因子の「阻害剤」または「アンタゴニスト」は、可溶性因子のレベルを阻害、不活性化、または低下させることができる剤の分子を指すために本明細書で使用される。阻害剤は、たとえば、結合して活性を部分的または完全にブロックし、可溶性因子、たとえば、アンタゴニストの活性または発現を低下、防止、遅延、活性化、不活性化、脱感作、またはダウンレギュレートする化合物である。阻害剤には、ポリペプチド阻害剤、たとえば、抗体、可溶性受容体など、ならびに核酸阻害剤、たとえば、siRNAまたはアンチセンスRNA、可溶性因子の遺伝子改変バージョン、たとえば、変化した活性を有するバージョン、ならびに自然発生および合成の可溶性因子アンタゴニスト、小化学分子などが含まれる。インヒビターを検出するためのアッセイには、たとえば、本明細書の他の場所に記載されるように、細胞または細胞膜においてインビトロで可溶性因子を発現し、推定上のアンタゴニスト化合物を適用し、次いで可溶性因子の活性に対する機能的効果を決定することが含まれる。

#### 【0102】

本明細書で使用する場合、「説明材料」には、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために用いることができる、出版物、記録、図表、またはその他の表現の媒体が含まれる。本発明のキットの説明材料は、たとえば、本発明の核酸、ペプチド、および/または組成物を含む容器に添付されてもよく、または核酸、ペプチド、および/または組成物を含む容器と一緒に出荷されてもよい。あるいは、説明材料は、説明材料および化合物が受取人によって協調的に使用されることを意図して、容器とは別に出荷されてもよい。

#### 【0103】

「単離」とは、天然の状態から改変または除去されたことを意味する。たとえば、生きている動物に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離」されていないが、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離」されている。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、またはたとえば、宿主細胞などの非天然環境に存在し得る。

#### 【0104】

本明細書で使用する「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点でレトロウイルスの中でユニークである。それらは有意な量の遺伝情報を宿主細胞のDNAに送達することができるため、遺伝子送達ベ

10

20

30

40

50



クターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV、FIVはすべてレンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボで有意なレベルの遺伝子移行を達成する手段を提供する。

【0105】

本明細書で使用される生物学的試料中の「可溶性因子のレベル」という語句は、典型的には、生物学的試料中に存在する可溶性因子のタンパク質、タンパク質断片またはペプチドレベルの量を指す。「可溶性因子のレベル」は定量化する必要はないが、対照試料からのレベルまたは対照試料に期待されるレベルと比較して、または比較せずに、たとえば、人間による主観的な視覚的検出などで、単に検出することができる。

【0106】

「マッサイトメトリー」または「CyTOF」は、抗体が蛍光色素ではなく重金属イオンタグで標識されるフローサイトメトリーのバリエーションである。読み出しは飛行時間型質量分析による。これにより、チャンネル間の大幅な波及なしに、単一の試料でより多くの抗体特異性を組み合わせることができる。

【0107】

本明細書で使用される場合、免疫応答の「調節」という用語は、処置もしくは化合物がない場合の哺乳動物における免疫応答のレベルと比較して、および/またはそれ以外は同一であるが未処置の哺乳動物における免疫応答のレベルと比較して、哺乳動物において免疫応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、天然のシグナルまたは応答を乱すおよび/または影響を与えることにより、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて有益な治療応答を媒介することを包含する。

【0108】

免疫原性組成物の「非経口」投与には、たとえば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、または胸骨内注射、または注入技術が含まれる。

【0109】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書では交換可能に用いられ、本明細書に記載の方法にしたがって、インビトロまたはインサイチュのいずれであっても、任意の動物またはその細胞を指す。特定の非限定的な実施形態では、患者、対象または個体はヒトである。

【0110】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖として定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で使用される核酸およびポリヌクレオチドは交換可能である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、これを加水分解して単量体の「ヌクレオチド」にすることができるという一般的な知識を有する。単量体のヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解され得る。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドは、これらに限定されないが、通常のクローニング技術およびPCR(登録商標)などを用いて、および合成手段により、限定されないが、組換え手段、すなわち、組換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られるすべての核酸配列を含む。

【0111】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は交換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基からなる化合物を指す。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含む必要があり、タンパク質またはペプチドの配列を構成できるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いに結合された2つまたはそれを超えるアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書で使用する場合、この用語は、たとえば、ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも当技術分野で一般に呼ばれる短鎖と、たとえば、多くのタイプが存在する、タンパク質と当技術分野で一般に呼ばれる長鎖と、の両方を指す。「ポリペプチド」は、たとえば、とりわけ、生物学的に活性な断

10

20

30

40

50

片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、修飾ポリペプチド、誘導體、類似体（アナログ）、融合タンパク質を含む。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0112】

本明細書で使用される「レトロウイルス」という用語は、レトロウイルス科のメンバーである。レトロウイルスは、一本鎖のプラスセンスRNAウイルスである。特定の実施形態では、レトロウイルスは、アルファ - レトロウイルス、ベータ - レトロウイルス、ガンマ - レトロウイルス、デルタ - レトロウイルス、イプシロン - レトロウイルス、レンチウイルスまたはスプマウイルスである。特定の実施形態では、レトロウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）およびウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）からなる群から選択されるレンチウイルスである。

10

【0113】

本明細書で使用される「同時投与」という用語は、併用療法における第1の療法および第2の療法が、約15分以下、たとえば、約10分、5分、または1分のいずれか以下などの時間間隔で投与されることを意味する。第1および第2の療法が同時に投与される場合、それら第1および第2の療法は、同じ組成物に（たとえば、第1および第2の療法の両方を含む組成物に）または別々の組成物に（たとえば、第1の療法が1つの組成物に、第2の療法が別の組成物に）含まれ得る。

【0114】

20

抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」という用語は、特定の抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体を意味する。たとえば、1つの種からの抗原に特異的に結合する抗体は、1つまたは複数の種からのその抗原にも結合し得る。しかし、そのような異種間反応性は、それ自体が特異的として抗体の分類を変更するものではない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体はまた、抗原の異なる対立遺伝子形態に結合し得る。しかしながら、そのような交差反応性はそれ自体、特異的として抗体の分類を変えるものではない。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語は、抗体、タンパク質、またはペプチドの、第2の化学種との相互作用への引用において用いることができ、相互作用が化学種に対する特定の構造（たとえば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味し、たとえば、抗体は一般にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、標識された「A」および抗体を含む反応において、エピトープAを含む分子（または遊離の標識されていないA）の存在は、抗体に結合した標識Aの量を減少させるであろう。

30

【0115】

「刺激」という用語は、刺激分子（たとえば、TCR/CD3複合体）とその同族のリガンドとの結合によって誘導される一次応答を意味し、それによって、シグナル伝達事象、たとえば、これらに限らないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達を媒介する。刺激は、特定の分子の変化した発現、たとえば、TGF- のダウンレギュレーション、および/または細胞骨格構造の再編成などを媒介することができる。

40

【0116】

本明細書で使用される「刺激分子」という用語は、抗原提示細胞上に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合するT細胞上の分子を意味する。

【0117】

本明細書で使用される「刺激性リガンド」は、抗原提示細胞（たとえば、aAPC、樹状細胞、B細胞など）上に存在する場合、T細胞上の同族の結合パートナー（本明細書において「刺激分子」として引用される）と特異的に結合し、それによって、これらに限らないが、活性化、免疫応答の開始、増殖などを含む、T細胞による一次応答を媒介することができるリガンドを意味する。刺激性リガンドは当技術分野で周知であり、とりわけ、ペプチドがロードされたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体

50

、およびスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

【0118】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発することができる生物（たとえば、哺乳動物）を含むことが意図される。例示的な対象には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。

【0119】

本明細書中で使用される場合、「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞である。実質的に精製された細胞はまた、それがその自然発生状態において通常関連している他の細胞型から分離されている細胞も指す。場合によっては、実質的に精製された細胞の集団は、均質な細胞の集団を指す。他の例では、この用語は、単に、それらが自然の状態ですべてに関連している細胞から分離されている細胞を指す。特定の実施形態では、細胞はインピトロで培養される。他の実施形態では、細胞はインピトロで培養されない。

10

【0120】

Tリンパ球または胸腺細胞としても知られる「T細胞」は、当技術分野で知られている。それは主に胸腺において生産される白血球のタイプである。T細胞は免疫系の一部であり、骨髄における幹細胞から発達する。それらは感染から身体を保護するのに役立ち、癌と戦うのに役立ち得る。T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体の存在により、B細胞およびナチュラルキラー細胞などの他のリンパ球と区別することができる。T細胞にはいくつかのサブセットがあり、それぞれに異なる機能がある。特定の実施形態では、T細胞はCD8+ T細胞である。本明細書では、用語CD8+ T細胞は、用語CD8 T細胞と交換可能に使用される。

20

【0121】

抗原-ナイーブT細胞（ナイーブT細胞、 $T_N$ ）は、プロフェッショナル抗原提示細胞（樹状細胞など）の表面上のMHC分子のコンテキスト内で同種抗原に遭遇した後、メモリーT細胞（ $T_{MEM}$ ）およびエフェクターT細胞（ $T_{EFF}$ ）に拡張して分化する。

【0122】

「メモリーT細胞」（ $T_{MEM}$ ）は、以前にそれらの同族の抗原に遭遇してそれに反応した、感染および潜在的な癌と闘うT細胞（Tリンパ球としても知られる）のサブセットである。したがって、抗原経験T細胞という用語がしばしば適用される。このようなT細胞は、細菌またはウイルスなどの外来の侵入者、ならびにがん細胞を認識することができる。メモリーT細胞は、以前の感染、がんとの遭遇、または以前のワクチン接種の間に、抗原と出会ったことによって「経験」されている。侵入者との2回目の遭遇で、メモリーT細胞は複製して、免疫系が最初に侵入者に応答したときよりも速くかつ強力な免疫応答をマウントすることができる。この挙動は、特定の抗原への暴露を明らかにすることができる、Tリンパ球増殖アッセイにおいて利用される。

30

【0123】

「エフェクターT細胞」（ $T_{EFF}$ ）は、共刺激などの刺激に積極的に応答するいくつかのT細胞型を含む、幅広い細胞のグループを表す。これには、CD4+、CD8+、細胞傷害性、ヘルパー、キラー、制御（調節）性、および潜在的な他のT細胞型が含まれる。

40

【0124】

「疲弊した（exhausted）T細胞」（ $T_{EX}$ ）は、感染、腫瘍、または癌を取り除く代わりに「疲弊」し、感染、腫瘍、または癌を取り除く、緩和する、または減らす能力が損なわれたT細胞である。疲弊したT細胞はCD8+ T細胞であり得る。疲弊したT細胞はCD4+ T細胞であり得る。疲弊したT細胞は、T細胞の機能を次第に失う。「疲弊（exhaustion）」または「無応答性」とは、細胞が通常の入力シグナルに応答して通常機能または活動を実行しない細胞の状態を指し、活性化受容体またはサイトカインによる刺激などの刺激に対する免疫細胞の屈折性（refractivity）を含む。そのような機能または活性には、これらに限らないが、増殖または細胞分裂、細胞周期への進入、サイトカイン産生、細胞毒性、輸送、食作用活性、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。通常の入力シグナ

50

ルは、これらに限らないが、受容体（たとえば、T細胞受容体、B細胞受容体、共刺激受容体など）を介した刺激を含み得る。

【0125】

「疲弊したT細胞集団」（T<sub>EX</sub>集団）は、疲弊したT細胞の集団である。T<sub>EX</sub>集団は、疾患を有する対象における疾患状態の特徴であり得る。疾患を有する対象における疾患状態の特徴であるT<sub>EX</sub>集団を同定するための方法が本明細書に供される。

【0126】

免疫抑制の一種である「T細胞疲弊」は、エフェクター機能の欠乏、抑制性受容体の持続的発現、および明確な転写状態を特徴とする（Wherry, Nat Immunol. 2011, 12（6）：492-9）。T細胞の疲弊は、エフェクター機能障害の状態、Programmed Death-1（PD-1、またはCD279）を含む高い抑制性受容体発現、転写リプログラミング、および欠陥のある免疫記憶を含む（Pauken et al. Science 2016, 354（6316）：1160-1165）。

【0127】

特定の実施形態では、たとえば、T細胞疲弊を検出または測定する場合、「対照T細胞」は、疲弊したT細胞ではないT細胞を指す。前記実施形態では、対照T細胞は、たとえば、T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、および/またはT<sub>MEM</sub>であり得る。対照T細胞の集団は、対照T細胞型の任意の組み合わせを指す。特定の実施形態では、たとえば、以前に疲弊したT細胞の再活化（reinvigoration）の程度を検出または測定する場合、「対照T細胞」は、疲弊したT細胞を指す。

【0128】

本明細書で使用される「治療（的）」という用語は、治療および/または予防を意味する。治療効果は、病状の抑制、寛解または根絶によって得られる。

【0129】

「治療（的）有効量」という用語は、研究者、獣医、医師または他の臨床医が求める、組織、系、または対象の生物学的または医学的応答を誘発するであろう対象化合物の量を指す。「治療有効量」という用語は、投与されたときに、治療されるべき障害または疾患の兆候または症状の1つまたは複数の発達を防止するか、または特定の程度まで軽減するのに十分である化合物の量を含む。治療有効量は、治療されるべき対象の、化合物、疾患およびその重症度、ならびに年齢、体重などに応じて変化するであろう。

【0130】

本明細書で使用される「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクト、形質転換または形質導入されている細胞である。細胞は、一次対象細胞およびその子孫を含む。

【0131】

本明細書で使用される「移植物（片）」は、個体に導入される細胞、組織、または臓器を指す。移植された材料のソースは、培養細胞、別の個体由来の細胞、または同じ個体由来の細胞であり得る（たとえば、細胞がインビトロで培養された後）。例示的な臓器移植物は、腎臓、肝臓、心臓、肺、および脾臓である。

【0132】

本明細書で使用される用語として疾患を「治療（処置）する」とは、対象が経験する疾患または障害の少なくとも1つの徴候または症状の頻度または重症度を低減することを意味する。特定の実施形態では、「治療する」には、疾患の症状の軽減、および、たとえば予防ワクチンなどの予防的治療の投与が含まれる。

【0133】

範囲：この開示全体を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で供され得る。範囲形式での記述は、単に便宜および簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記述は、すべ

10

20

30

40

50

ての可能な部分範囲とその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると思なされるべきである。たとえば、1～6などの範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの具体的に開示されたサブ範囲、およびその範囲内の個々の数値、たとえば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6などを具体的に開示していると思なされるべきである。これは、その範囲の幅に関係なく適用される。

#### 【0134】

##### 記述

本開示は、疾患を有する患者において疲弊したT細胞を検出および追跡するための方法を提供する。本開示はまた、疾患を有する患者を治療するための方法も提供する。本開示はまた、疾患を有する患者のための治療における変更を決定するための方法も提供する。特定の  
10 実施形態では、疾患は腫瘍である。特定の実施形態では、疾患は癌である。特定の実施形態では、疾患は感染性疾患である。

#### 【0135】

特定の実施形態では、疾患を有する患者において疲弊したT細胞を検出および追跡するための方法は、ハイパラメーターマスマイトメトリーパネルを含むエピゲノムアッセイを用いて、ナイーブ、エフェクター、および/またはメモリーT細胞と比較して疲弊したT細胞にユニークなエピゲノムのシグネチャを同定する段階を含む。ここで、そのアッセイは、単一細胞プロテオミクス同定および疲弊したT細胞の評価を可能にする。特定の実施形態では、疾患を有する患者を治療するための方法は、ナイーブ、エフェクター、および/またはメモリーT細胞と比較して、疲弊したT細胞に特有のエピゲノムのシグネチャを同定  
20 するためにエピゲノムアッセイを用いることにより、最初の処置の前および後に患者において疲弊したT細胞を検出する段階を含む。ここで、前記最初の処置の後に前記患者において疲弊T細胞数が減少した場合は、患者において免疫応答を増加させる第2の処置が患者に施され、最初の処置の後に患者において疲弊T細胞数が減少しなかった場合、免疫学的応答を増加させる第2の治療が施されるか、または患者において免疫学的応答を調節する第2の処置が施される。特定の実施形態では、疾患を有する患者において処置の変更を決定する方法は、処置の前および後に患者における疲弊したT細胞を追跡し、サイトメトリーアッセイを用いて、ナイーブ、エフェクター、および/またはメモリーT細胞と比較して疲弊したT細胞に特有のエピゲノムのシグネチャを同定することを含む。ここで、エピゲノムのシグネチャが同定されると、患者の免疫学的応答を増加させるであろう処置の変  
30 更が決定される。

#### 【0136】

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的な疲弊したT細胞( $T_{EX}$ )集団を同定する方法も提供する。その方法は、

(d) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(e) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT細胞疲弊特異的( $T_{EX}$ )マーカーまたは $T_{EX}$ 特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

(f) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパ  
40 ネルの発現と比較する段階と、

(g) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数の $T_{EX}$ 集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的な $T_{EX}$ 集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは複数のマーカーを発現する $T_{EX}$ 細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞におけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数の $T_{EX}$ 細胞を含む、段階と、  
を含む。

#### 【0137】

特定の実施形態では、前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数の $T_{EX}$ 特異的マーカーまたはマーカー  
50

の組み合わせは、CD45RA<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>-</sup>、Tim-3<sup>MMI</sup>、LAG-3<sup>MMI</sup>、TCF1<sup>MMI</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD26<sup>+</sup>、CD7<sup>MMI</sup>、CD127<sup>+</sup>、PD-1<sup>-</sup>/CD127<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Granzyme B<sup>+</sup> (GzmB<sup>+</sup>)、Tbet<sup>+</sup>、Granzyme K<sup>+</sup> (GzmK<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、Eomesodermin<sup>+</sup> (Eomes<sup>+</sup>)、2B4<sup>+</sup>、KLRG1<sup>+</sup>、Granzyme M<sup>+</sup> (GzmM<sup>+</sup>)、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/2B4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD127<sup>+</sup>、CD200R<sup>MMI</sup>、CD103<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>MMI</sup>、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>MMI</sup>、CD39<sup>+</sup>、CD36<sup>+</sup>、および Ptger2<sup>MMI</sup>からなる群から選択され、かつ、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせは、発現の増加を示す(+)および発現の減少を示す(-)を用いる手動のゲーティングにより、または中央金属強度(median metal intensity)(MMI)により評価される。

10

## 【0138】

特定の実施形態において、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および/または1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはマーカーの組み合わせは、表4に列記されるものである。特定の実施形態において、疲弊特異的遺伝子または疲弊特異的遺伝子のセットは、図41Cに列記されるものである。

## 【0139】

特定の実施形態において、前記1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせは、CD27<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、およびCD103<sup>+</sup>からなる群から選択され、かつ、前記1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせは、CTLA-4<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、CD73<sup>-</sup>、CD127<sup>-</sup>、CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、XCL1<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、CCR7<sup>-</sup>、IL-21<sup>+</sup>、TCF1<sup>-</sup>、CXCL10<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、Amphiregulin<sup>+</sup> (Areg<sup>+</sup>)、CD38<sup>+</sup>、TOX<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>、および Ptger2<sup>+</sup>からなる群から選択され、ここで、前記マーカーまたはマーカーの組み合わせは、発現の増加を示す(+)および発現の減少を示す(-)を用いる手動のゲーティングにより評価される。

20

## 【0140】

特定の実施形態において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせおよび1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせを含む前記マーカーのパネルは、

30

(l) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>;

(m) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;

(n) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>;

(o) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、Tbet<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

(p) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>;

(q) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>;

40

(r) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;

(s) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

(t) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;

(u) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、Tbet<sup>+</sup>、Tox<sup>int</sup>; および

(v) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、Tbet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>;

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、ここで、該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現は、増加した発現を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現

50

を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される。

#### 【0141】

疾患を有する対象において疾患状態に特徴的なT細胞集団を同定する方法も供する。その方法は、

(d) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

(e) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および1つまたは複数のT<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

10

(f) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

(g) 疾患に特徴的な1つまたは複数のT細胞集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT細胞集団が、T細胞を含む対照試料において同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT細胞の数と比較して、疾患を有する対象からのT細胞におけるパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT細胞を含む、段階と、

を含む。

#### 【0142】

特定の実施形態において、前記パネルは、2B4、CCR7、CD103、CD127、CD16、CD160、CD200R、CD26、CD27、CD28、CD36、CD38、CD45RA、CD57、CD7、CD73、CTLA-4、CXCR5、Eomes、GzmB、GzmK、GzmM、Helios、HLA-DR、Ki67、KLRG1、LAG-3、PD-1、Perforin、PTGER2、T-bet、TCF-1、TIGIT、TIM-3、TOX、2B4/CD160/TIGIT、CD160/TIGIT、CD38/39、CD45RA/CD27、PD-1/CD127、PD-1/CD39、およびPD-1/Eomesからなる群から選択される少なくとも3つのマーカーまたはマーカーの組み合わせを含む。

20

#### 【0143】

特定の実施形態において、前記マーカーのパネルは、

(l) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7、Helios、CD103、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>;

30

(m) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;

(n) CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>-</sup>、2B4<sup>-</sup>、TIGIT<sup>-</sup>、CD160<sup>-</sup>、CD7<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>;

(o) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

(p) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>;

(q) PD-1<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD39<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、CD200R<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、Lag-3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>;

(r) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;

40

(s) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>-</sup>;

(t) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;

(u) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>-</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>int</sup>; および

(v) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>;

からなる群から選択されるマーカーのセットを含み、ここで、該マーカーまたはマーカーの組み合わせの発現は、増加した発現を示す(+)、(++)、または(+++)、中間の発現を示す(int)、および、減少した発現を示す(-)を用いる手動のゲーティングによって評価される。

50

## 【 0 1 4 4 】

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法も供する。その方法は、

( g ) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

( h ) 前記疾患を有する対象からのT細胞において、1つまたは複数のT細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、1つまたは複数のT細胞疲弊特異的 ( T<sub>EX</sub> ) マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含むマーカーのパネルの発現を測定する段階と、

( i ) 該マーカーのパネルの発現を、T細胞を含む対照試料におけるマーカーの同じパネルの発現と比較する段階と、

( j ) 前記疾患に特徴的な1つまたは複数のT<sub>EX</sub>集団を同定する段階であって、該疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団が、T細胞を含む対照試料中のマーカーのパネルにおける同じ1つまたは複数のマーカーを発現するT<sub>EX</sub>細胞の数と比較して、前記疾患を有する対象からのT細胞におけるマーカーのパネルにおける1つまたは複数のマーカーの発現が上方制御または下方制御されている、より多数のT<sub>EX</sub>細胞を含む、段階と、

( k ) 段階 ( a )、( b )、( c )、および ( d ) を1つまたは複数の後続の時点で繰り返す段階と、

( l ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料より、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団においてより多数の細胞を含む場合に、疾患が進行していることを決定する段階と、

( m ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料より、前記疾患に特徴的なT<sub>EX</sub>集団においてより少数の細胞を含む場合に、疾患が進行していないことを決定する段階と、を含む。

## 【 0 1 4 5 】

特定の実施形態において、前記マーカーのパネルは、少なくとも1セットの、

( g ) PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>、Ptger2<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>、およびLAG-3<sup>+</sup>;

( h ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>/CD39<sup>-</sup>、T-bet<sup>+</sup>、およびGzmK<sup>-</sup>;

( i ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Helios<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、PD-1<sup>++</sup>、Ki67;

( j ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、および PD-1<sup>+</sup>/CD39<sup>+</sup>;

からなる群から選択されるT<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の疾患関連集団 ( DAT ) の特徴を示す、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、を含み、かつ、

前記マーカーのパネルが、少なくとも1セットの、

( k ) TIGIT<sup>+</sup>、Eomes<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、T-bet<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD57<sup>+</sup>、Perforin<sup>+</sup>;

( l ) PD-1<sup>+</sup>、CD160<sup>+</sup>、TIGIT<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>、CXCR5<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、TCF1<sup>+</sup>;および

( m ) PD-1<sup>+</sup>/Eomes<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>/CD160<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>、GzmB<sup>+</sup>、Tox<sup>+</sup>、GzmK<sup>+</sup>.

からなる群から選択されるT<sub>EX</sub>細胞の1つまたは複数の健康関連集団 ( HAT ) の特徴を示す、T細胞系統特異的マーカーまたはT細胞系統特異的マーカーの組み合わせ、および、T<sub>EX</sub>特異的マーカーまたはT<sub>EX</sub>特異的マーカーの組み合わせ、をさらに含む。

## 【 0 1 4 6 】

特定の実施形態において、前記方法は、HATに対するDATの比率を計算する段階をさらに含む。特定の実施形態において、HATに対するDATの比率が対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において増加する場合に疾患は進行しており、HATに対するDATの比率が対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料において減少する場合に疾患は進行していない。

10

20

30

40

50



## 【 0 1 4 7 】

対象のT細胞の疲弊状態を決定する方法も供する。その方法は、

( e ) 対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

( f ) 該T細胞を刺激または活性化する段階と、

( g ) T細胞による、IFN<sup>-</sup>、TNF<sup>-</sup>、IL-2、IL-10、IL-21、CCL3、CCL4、XCL1、およびアンフィレギュリンからなる群から選択される1つまたは複数のサイトカインおよび1つまたは複数のケモカインの生産を測定する段階と、

( h ) 次式：

$$FES=[(2 \times (\%IFN^{+}TNF^{-})-(\%IFN^{-}TNF^{+})-(\%IL-2^{+})) \times (\%CCL3/4^{+})]$$

( 式中、「%IFN<sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>」は、TNF<sup>-</sup>ではなくIFN<sup>+</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、  
「%IFN<sup>-</sup>TNF<sup>+</sup>」は、IFN<sup>-</sup>ではなくTNF<sup>+</sup>を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%IL-2<sup>+</sup>」は、IL-2を産生するT細胞の割合(%)を示し、「%CCL3/4<sup>+</sup>」は、CCL3および/またはCCL4を産生する細胞の割合(%)を示す )

のとおり機能疲弊スコア(FES)を計算する段階と、

( e ) 対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階であって、FES 0は対象のT細胞が疲弊していることを示し、FESが高いほど対象のT細胞の疲弊の程度が増加していることを示す、段階と、

を含む。

## 【 0 1 4 8 】

疾患を有する対象において疾患の進行を監視する方法も供する。その方法は、

( f ) 前記対象からのT細胞を含む試料を得る段階と、

( g ) 上記の方法により該対象のT細胞の疲弊状態を決定する段階と、

( h ) 段階( a ) および( b ) を1つまたは複数の後続の時点で繰り返す段階と、

( i ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して増加したFESを含む場合に、疾患が進行していることを決定する段階、または

( j ) 前記対象からのT細胞を含む第2の試料または後の試料が、該対象からのT細胞を含む第1の試料または前の試料と比較して減少したFESを含む場合に、疾患が進行していないと決定する段階と、

を含む。

## 【 0 1 4 9 】

先の実施形態のいずれか1つにおいては、対象からのT細胞を含む試料は、血液、腹水、胸水、リンパ液、粘液、気管支肺胞洗浄液、または組織を含み得る。特定の実施形態において、対象からのT細胞を含む試料は、CD8<sup>+</sup>T細胞、腫瘍関連リンパ球(TAL)、または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む。

## 【 0 1 5 0 】

疾患

特定の実施形態において、疾患は、癌、ウイルス感染症、細菌感染症、および寄生体感染症からなる群から選択される。さらなる実施形態において、ウイルス感染症は、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオマウイルス、アネロウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、およびインフルエンザウイルスからなる群から選択される。特定の実施形態において、疾患は、結核菌(MTB)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)、カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、大腸菌(Escherichia coli)、リステリア菌(Listeria monocytogenes)、サルモネラ・エンテリカ(Salmonella enterica)、サルモネラ・ボンゴリ(Salmonella bongori)、およびコレラ菌(Vibrio cholera)からなる群から選択される細菌感染症である。特定の実施形態において、癌は、免疫チェックポイント阻害剤での処置に対して応答性である。さらなる実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤での処置に対して応答性である癌は、切除不能な黒色腫、転移性黒色腫、ステージIII黒色腫、転移性非小細胞肺癌(NSCLC)、NSCLC、

10

20

30

40

50

頭頸部の再発性扁平上皮がん（SCCHN）、転移性腎細胞がん（RCC）、尿路上皮がん、肝細胞がん（HCC）、膀胱がん、結腸直腸がん、卵巣がん、および内皮がんからなる群から選択される。

#### 【0151】

##### T細胞の刺激および/または活性化

特定の実施形態では、T細胞は、ホルボール12-ミリスレート13-アセート（PMA）およびイオノマイシンで刺激および/または活性化され得る。さらなる実施形態では、T細胞は、モネンシンおよびブレフェルジンA（BFA）の存在下で、PMAおよびイオノマイシンで刺激および/または活性化される。T細胞を刺激および/または活性化する方法は当技術分野で知られている。細胞分泌経路を介したタンパク質輸送を阻害するブレフェルジンA（「BFA」）および/またはモネンシンの存在下で活性化ステップを実行することにより、サイトカインタンパク質が細胞に蓄積し、検出することができる。

10

#### 【0152】

特定の実施形態では、T細胞は、抗CD3抗体、抗CD28抗体、または抗CD2抗体（またはそれらの組み合わせ）で刺激および/または活性化され得る。さらなる実施形態では、抗CD3抗体、抗CD28抗体、または抗CD2抗体（またはそれらの組み合わせ）は、ビーズなどの固体基質に結合させてもよい。

#### 【0153】

##### エンハンサーの状態

本開示は、T細胞の集団におけるエンハンサーの状態を同定するための方法を供する。本開示はまた、患者からのT細胞の集団におけるエンハンサー状態を同定する段階、および本開示の操作されたT細胞を患者に投与する段階を含む、疾患を有する患者を治療する方法を供する。細胞のエンハンサーの状態とは、細胞のエピゲノム内のエンハンサーがオープンクロマチン領域（OCR）にあり、それゆえ潜在的に活性であることを同定することを指す。特定の実施形態では、細胞のエンハンサー状態は、疲弊した、ナイーブ、エフェクターまたはメモリーT細胞を規定する、オープンおよびクローズのクロマチン領域の特定のパターンを指す。

20

#### 【0154】

##### エピジェネティック経路

本明細書に記載される場合、エピジェネティック経路は、細胞の「エピゲノム」またはエピゲノム状態に寄与する成分の任意の組み合わせを含む。

30

#### 【0155】

「エピジェネティック経路」という用語は、安定して遺伝可能なエピジェネティックな状態と一緒に確立および維持するそのような信号を送信するシグナルまたは生物学的構成要素の組み合わせを指す。特定の実施形態では、エピジェネティック経路は、エピジェネティック経路の開始をトリガーする環境から生ずるシグナル、このシグナルを受容して特定のエピゲノム状態を確立するための正確なクロマチン位置および/またはDNA環境を決定することができるエピジェネティックイニシエーター、ならびに、初期および後続世代における特定のエピジェネティックな状態を維持するエピジェネティックメインテナー（maintainer）を含む。

40

#### 【0156】

##### 高優先度エピジェネティック経路

本開示は、患者において疾患を治療する方法を提供する。その方法は、操作されたT細胞を患者に投与する段階を含み、ここで、その操作されたT細胞は、1つまたは複数の高優先エピジェネティック経路において1つまたは複数の変更を含む。特定の実施形態では、その変更は、ゲノム工学アプローチを介して導入された遺伝子改変、またはエピジェネティックレギュレーターの阻害剤もしくは活性化剤を用いるエピジェネティックな改変を含む。特定の実施形態では、高優先度エピジェネティック経路は、T細胞の疲弊を逆転または防止するために標的とされるか、または標的とされている。特定の実施形態では、高優先度エピジェネティック経路は、ゲノム工学により、たとえば、エピジェネティック経

50

路の遺伝子をノックアウト/インすることによって、またはエピジェネティック経路の遺伝子をコードするタンパク質の機能を変更することによって、標的にされている。特定の実施形態では、高優先度エピジェネティック経路は、エピジェネティック経路を改変する薬物を患者に投与することによって標的化される。特定の実施形態では、高優先度のエピジェネティック経路は、エピジェネティックレギュレーターの発現を制御する位置において非コーディングゲノムの遺伝子工学によって標的とされる。たとえば、遺伝子の発現パターンを変化させるであろう欠失または改変され得る疲弊のエピジェネティックレギュレーターの遺伝子座においてオープンである疲弊特異的エンハンサーがある。特定の実施形態では、遺伝子は、疲弊の主要なエピジェネティックレギュレーターである *Tox* であり、遺伝子座は *Tox* 遺伝子座である。

10

#### 【0157】

高優先度のエピジェネティック経路は、次の基準の1つを満たす遺伝子、遺伝子座、またはタンパク質である：a) エピジェネティックマークを生成もしくは変化するのに既知のまたは潜在的な役割を有する遺伝子/タンパク質、またはb) 疲弊T細胞において明確なエピジェネティック改変も有する転写プロファイリング研究に基づくT細胞疲弊において既知の役割を有する遺伝子。特定の実施形態では、高優先エピジェネティック経路は、*Tox*、*SET*タンパク質、*RuvBl1*タンパク質、*RuvBl2*タンパク質、*DPY30*タンパク質、*Tox2*、*Suv39h2*、*Csprs*、*Sfmbt1*、*Hmgn3*、*Chd9*、*Rnf2*、*Ikzf3*、*Kmt2e*、*Satb1*、*Tet1*、*Tet2*、*Tet3*、*Kdm5b*、*Sfmbt2*、*Actr6*、*Prmt7*、抑制性受容体および/またはT細胞転写因子をコードする遺伝子、および他の関連T細胞遺伝子、たとえば、*PD-1*、*CTLA-4*、*LAG-3*、*Tim3*、*CD200/CD200R*、*Ptger2*、*Ptger4*、*T-bet*、*Eomes*、*Tox*、*Blimp1*、*BATF*、*AP-1*ファミリーメンバー、*IRF4*、およびWherry et al.、Doering et al.、および/または Crawford et al.（引用により全体が本明細書に組み込まれるWherry et al. *Immunity* 2007, 27:670-684、引用により全体が本明細書に組み込まれるDoering et al. *Immunity* 2012, 37:1130-1144、引用により全体が本明細書に組み込まれるCrawford et al. *Immunity* 2014, 40(2):289-302）に記載される他の遺伝子、のうちの少なくとも1つにおけるエピジェネティックな変化を含む。

20

#### 【0158】

##### エピジェネティック標的

特定の実施形態では、エピジェネティック経路に関連する標的、または本明細書で使用する場合の「エピジェネティック標的」は、以下にさらに記載されるように、剤により、またはCRISPR/Cas9ターゲティングを介したゲノム工学により、細胞内で標的化される。特定の実施形態では、エピジェネティック標的は、*Tet*酵素（たとえば、*Tet1*、*Tet2*）、*HDAC*、*Tox*、*Tox2*、*Csprs*、*Drud1*、*Sfmbt1*、*Chd9*、*Suv39h2*、*Sap30L*、*Hmgn3*、*BAZ2b*、*Prmt6*、*SET*、*Ruvbl1/2*、*DPY30*、*MLL*タンパク質、*Ezh1/2*、*PRC*複合体、*CBP*、*BET*、および/またはp300である。特定の実施形態では、エピジェネティック標的は、任意のヒストンアセチルトランスフェラーゼ、デアセチラーゼ、メチラーゼ、またはデメチラーゼ、または任意の他のエピジェネティック修飾酵素またはクロマチン修飾酵素であり得る。特定の実施形態では、エピジェネティック標的は、エピジェネティックパターンを調節することができる酵素または細胞内タンパク質である。特定の実施形態では、エピジェネティックな標的は、下流のエピジェネティックな経路を調節する細胞表面タンパク質である。特定の実施形態では、エピジェネティックな標的は、

30

40

EHMT2, KDM4A, RAD54L2, PHF8,  
 SIRT2, ATF2, KDM3B, TET2, BRD4, KDM2B, BRD9, MINA, SMARCA1, HDAC2,  
 TRIM28, KDM5C, CARM1, EHMT1, JMJD8, CHD1L, BRPF1, SETD1A, CHD4, SETDB1,  
 NAT10, SIRT7, BRD8, HLTf, PBRM1, SETDB2, SUV39H2, EZH2, HELLS, ATAD2,  
 RAD54L, SETD8, HAT1, RPA3, SMYD2, TAF1, BRD7, HDAC3, TTF2, BAZ1B, SUV39H1,  
 HDAC1, SMARCA4, BRD3, FEV, JMJD6, ACAT1, SETD6, SETD4, CLOCK, SMYD3,  
 KDM6B, KDM6A, SIRT1, SMARCA1, HDAC5, SP100, ELP3, KAT2A, INO80, CHD3,  
 KDM4B, HDAC8, SETD1B, HDAC7, SETD7, TET1, ZMYND11, CHD8, CREBBP, SHPRH,  
 TET3, HDAC4, NSD1, TRIM33, ERCC6, PHIP, BRD1, KAT2B, CHD1, EP400, NCOA2,  
 BAZ2A, JARID2, SETD5, SUV420H2, ATRX, ZMYND8, HIF1AN, BRPF3, KDM5A,  
 TRIM24, KDM4C, BRD2, CHD9, EZH1, BRWD1, SMARCA2, KDM5B, PRDM2, CHD2,  
 SUV420H1, ASH1L, BPTF, CHD6, KDM3A, EP300, SETD2, JMJD1C, ATAD2B, BAZ2B,  
 BRWD3, JMJD4, CHD5, PHF2

10

のうちの少なくとも1つである。特定の実施形態において、細胞はT細胞である。特定の  
 実施形態において、細胞は疲弊T細胞である。

20

【0159】

#### 転写標的

エピゲノムは、転写因子が機能するコンテキストを供する。グローバルなエピジェネテ  
 ィックな景観情報は、疲弊したT細胞について、以前には存在しなかったが、(PD1をエン  
 コードする) Pdccl1遺伝子座の研究は有益であった。急性的に解決されたLCMV感染に  
 おけるPdccl1プロモーター領域の分析は、これらの領域がエフェクター・フェーズにおい  
 て広く脱メチル化され、後に、感染が解決されてCD8+ T細胞メモリーが形成されるにつ  
 れて再メチル化されることを示しました。対照的に、慢性LCMV感染においてPdccl1遺伝  
 子座は完全に脱メチル化され、ウイルスタイターおよび疲弊CD8+ T細胞によるPD1タン  
 パク質発現が減少した場合でも、再メチル化は観察されなかった(Youngblood et al. Im  
 munity. 2011, 35(3):400-12)。十分に制御されたHIV感染を調べた研究でも同様のデー  
 タが得られた(Youngblood et al. J Immunol. 2013, 191(2):540-4133)。本開示  
 は、CD8+ T細胞疲弊における遺伝子発現のエピジェネティック調節が疲弊を防止または  
 逆転できることを教示し、エピゲノムにおける疲弊の耐久性のある痕跡(imprint)の  
 証拠を供する。

30

【0160】

特定の実施形態では、エピジェネティック経路に関連する転写標的、または本明細書で  
 使用される「転写標的」は、細胞内において標的化される。特定の実施形態では、転写標  
 的は、Tox、SETタンパク質、RuvBI1タンパク質、RuvBI2タンパク質、DPY30タンパク  
 質、Tox2、Suv39h2、Csprs、Sfmbt1、Hmgn3、Chd9、Rnf2、Ikzf3、Kmt2e、Sat  
 b1、Tet1、Tet2、Tet3、Kdm5b、Sfmbt2、Actr6、およびPrmt7のうちの少なくとも  
 1つである。特定の実施形態では、転写標的は、Pdccl1、Ccr7、Gzmb、Lef1、Itgam、  
 Itgax、Itgad、Cd44、Kcnj8、Lrrc9/Rtn1、Ifng、Tbx21、Cxcr5、Il10、Nlrc3、C  
 d200r、および/またはAtp8b4のうちの少なくとも1つである。特定の実施形態では、転  
 写標的は、以下：

40

A330093E20Rik, Rnf19a, 2010010A06Rik, Cdh23, Abtb2, Dync2li1, Lrrc1, Scn1b, Man1a, Gimap3, Lef1, Col26a1, Gpr180, Fam126a, Wdyhv1, Mir6395, Gpr34, Fcgr1, Rpia, A430107P09Rik, Hbs1l, Slc35b3, Tmem248, Cox7a2l, BB019430, Pde5a, Sept7, Lrrc3b, Cd101, Znrf3, Znrf1, Gm6260, Prpf40a, Ets1, Scn3a, Kremen1, Fam210a, Trpm1, Pip4k2a, Trnp1, Sell, Nfia, Lipa, Zc3hc1, Msgn1, Yeats4, Abcd2, Tbc1d1, Kcnh8, Zfp407, Capg, Gm7538, Rgcc, Sh3bp5, S1pr1, Zfp957, Mcur1, D16Ert472e, Trat1, Fam107b, Mbtps1, Egr3,

10

Palm3, 9030624G23Rik, Ppp6r1, Ckap4, Rngtt, Crtc3, Peak1, Lhx2, Btg1, Serbp1, Cd2, Acox1, Hormad2, Gm10684, Smo, A630075F10Rik, Ndst1, E030018B13Rik, Skp1a, Kcnh8, Nck2, Frmd7, Cldn10, Peli1, 2010300C02Rik, Ins15, Supt20, Slc4a4, Rph3al, Dip2c, Pm20d2, Nsg2, Rbm26, Tpk1, Stambpl1, AF357399, Car2, Mir145b, Zfp592, Galnt4, Gm5083, Thns1l, Dhx40, Gm20098, Ly6i, Sugt1, Ywhaz, Rad23b, Bcor, Gm12159, Vegfa, Cacna1b, Arhgef11, 2210408F21Rik, Mettl8, Wdr73, Usp12, Art4, Clvs1, Mir6388, Diap2, Gm10532, Msi2, 4930546C10Rik, Mbnl1, Tm6sf1, Ppp2r5a, Mageb16-ps1, Neurl1b, Sspn, Suv420h1, 2410088K16Rik, Rgl2, Timm8a2, Aebp2, Mam12, Ldhal6b, Peak1, Parp2, Apbb2, Tctex1d1, Dtnb, Tspan3, 4930578N18Rik, Pced1b, Commd9, Lrrc3b, Rras2, Gm10638, 1600002D24Rik, Arsb, Ube2e2, 1700009P17Rik, P4ha2, Susd1, Cdkal1, Efcc1, Malat1, 4931403G20Rik, Tox, Arpc3, Atg10, Gpbp1, Gm5148, AI317395, Abhd2, Celsr1, Tsen2, Pfkfb3, Cyc1, Mir378c, Slamf6, Btg1, Phf2, Cxcr4, Gm10789, At12, 6030407O03Rik, Ggnbp1, Angpt1,

20

9530077C05Rik, Basp1, Rapgef6, H2-Ea-ps, Fam214a, Ppfia4, Lta4h, Ets2, Slc29a1, Xpo4, Gramd3, Itfg3, Fli1, Frmd6, Rbp1, Olfm13, Peli1, Srpkl, Hmgcs1, Irf2bp2, Cxxc5, Ccdc171, Cntnap2, Fance, Cblb, Cubn, Sfmbt2, Srsf3, Pepd, Dgkd, Osbp16, Trib2, Zfand3, Dchs1, 5430421F17Rik, Fpr3, Dapl1, Trat1, 0610040J01Rik, Gm14005, BC051019, Tank, Tnfsf11, Rara, Pik3c2a, Elmo1, Nck2, Bcl2l11, Fam78a, Gm10638, Prkcq, Gpr126, Bach2, Ttc30b, Nlk, Ube2e2, Usp3, 4932441J04Rik, Larp4b, Serbp1, Dbn1, Vav3, Der1l, H2-T23, C130021I20Rik, Fbxl14, Ets1, Fgf8, Abl2, Acvr1b, Upk1b, Efcab10, Uchl3, Cd302, Cdc40, Nsg2, Tmem222, P2ry10, Klrb1b, Mc1r, Car8, BC048403, Taf8, Atp1b1, Mir30c-2, Luc7l2, Erbb4, Arhgdib, Ube2h, Itrp2, Vav3, Ptgfrn, D630010B17Rik, Eif2s3x, Vav3, Nfe2l3, Ccdc171, Figl1, 4930519F09Rik, 1700123O12Rik, Acsf2, Ndubf9, Atp7a, Upp2, Ptpla, Man1a, Rgs3, Zbtb2, Trib2, Npr1, Fez2, Tle4, Fuca1, Cmip, Bcap29, Syne1, Dmbt1, Ell, Blnk, Sepw1, Gltsr1, Erdr1, Med13l, Moxd1, Btg1, Akap6, 1810053B23Rik, Rsu1, Gprasp2, Art4, Gpd2, Tmlhe,

30

A430107P09Rik, Kcnj9, Atp8a1, Adam6b, 2010109I03Rik, Spred2, Raver2, Ap1m2, Dclrela, Rbp7, Gcc1, Traf4, Satb1, Gm5538, Il12a, Fam60a, Thrb, Elk3, Vps45, Tle4, Akap13, Gprin3, Sox21, Emp1, Wfdc2, Slc45a1, Lnpep, Rapgef6, Txn2, Frmd4b, Myoz3, Zfp870, Bcl6, Mvb12b, Ntrk3, Spaca1, Mir701, Cdca7, Gm5083, S1pr1, Spry4, Cck, Il6st, Hebp2, Slc43a2, Tdrd5, Gm5833, Mir7-2, Mir1931, Pdgbf, 1700052N19Rik, Nfkbiz, Gm20753, Hapln1, Rras2, Diap2, Manba, Cers6, Rasgrp1, Lnpep, Apln, Ephb2, Arpp21, Mical3, Chic2, E130114P18Rik, Ipcef1, Dyrk2, Bach2, Mir122a, B230206H07Rik, Ceacam9, A730006G06Rik, 4930542C21Rik,

40

50

A430107P09Rik, Trat1, Ccr2, H2-Ob, Adm, Yeats4, Ccne1, Gpc5, Spsb1, Jrkl, Orc4, Camkmt,  
 Nfia, Celf2, Gadd45a, Gtf2a1, Nrde2, Nipa2, Rmi2, Lcor, Btg1, Atg10, D6Ertd527e, Ccm2,  
 Dpysl2, Dirc2, Cpm, Arhgap15, A730043L09Rik, Raph1, Cst10, Slc7a13, Ramp1, Atp1b1,  
 Zfp120, Slc39a13, Zfp706, Agr2, Tagap, Mir3110, Ubash3b, Dnmt3aos, H2-B1, Agbl1, Smc6,  
 1700060C20Rik, Trib2, A930005H10Rik, Btg1, Scml4, Mir196b, Efna5, Tmem14a, Kcnj15,  
 Snrpd3, Nnmt, Ryr1, Ptk2, P2rx4, 5830428M24Rik, Commd3, Cd28, Hspb11, BC021785, Tcf7,  
 Cstb, Art4, Tet3, Map3k13, Camkv, Ralbp1, 9330175M20Rik, Tgtp1, Selt, Irgc1, Tcf7, Tet1, 10  
 Bnip31, Nrbf2, Nim1k, Rfx8, Tlr6, Grik1, Tox, 1700061G19Rik, Dhrrs3, 4930519G04Rik, Mid1,  
 Aplar, Basp1, Aqp4, 4930415F15Rik, Aif1, Rnf125, Fam134b, Atp13a3, Dmbt1, Mbnl1,  
 Nfam1, Lmo4, Znrf1, Ambp, 4930523C07Rik, Bfsp2, Zfp592, Gm2447, Gm16157, Gjd3,  
 Tgtp1, Ston2, Lypd6b, Rnf7, Zbtb2, BC051537, 4930417O13Rik, Arntl, Ttc9b, Foxp1, Mir7219,  
 Mrgprb5, Tnik, Dhrrs3, Foxp1, Tubb2a, Cyb5r2, Itga4, Snx9, Fam65b, C78339, Mir7212,  
 Ldlrap1, H2-Oa, Snx12, Tdrp, Mnd1-ps, Foxp1, Gucy2c, Creb1, Scn4b, Irf4, Rftn2, Gpr125,  
 Dpf1, Fam134b, Akap13, Tmem108, Suclg1, Mn1, Sema4b, Gm6682, Slc46a2, Dennd3, Bach2,  
 Sytl2, Grhl3, Smad3, 1600014C10Rik, 4930455C13Rik, 3200001D21Rik, Nup153, Grk6, 20  
 Zfhx3, Fhit, Hmg20b, 4930564D02Rik, Bach2, Slc39a3, Urad, Smc1a, Mam11, Zadh2,  
 8030462N17Rik, Fsbp, Tmem243, Srp14, Lix1, Tmc1, Tspan11, Tns1, Serpinb5,  
 1810026B05Rik, Smad7, Mir3108, Phxr4, Tmem131, Olfr1507, Kidins220, Mir378c, Afap1,  
 Rere, Sin3b, Efemp2, Neto2, Mir7669, Tgtp1, Gramd3, Map7d2, Chst2, Sp110, Ccdc162, Igflr,  
 Mir3110, Dcdc2b, Dse, Dlgap2, Armc9, E230029C05Rik, Gm11944, Tnik, Kat6b, Nkiras1,  
 Tbccl, B4galt1, Cd2ap, Tnks, Icos, Tanc1, Sik1, Tor1aip2, 4930453N24Rik, Bnip1, Gm6313,  
 4930415F15Rik, Inpp5a, Atoh7, 2210417A02Rik, Pdss2, Lamtor3, Ptbp2, Ostm1, Nrarp, Fryl,  
 Mir1907, Gm10638, Sumo1, Zfp60, 1600014C10Rik, Haao, Syde2, Ep300, Ndr3, Tex2, Cdx2, 30  
 Eefsec, Tmem131, Mir6959, Fyn, Prkceq, Mical3, Snhg7, Ambra1, Rag2, Vdac1, Ptpla, Tram1,  
 Aak1, Pebp4, Sgpp1, 2410007B07Rik, Itpr2, Tulp2, Mir6395, Elovl6, Ppp1r3b, Zc3h4, Sptbn4,  
 Rap1b, Vgll4, Kcna2, Cnot6, Tbc1d1, Pde4d, Rapgef4, Fbxo47, Proca1, Airn, 2310001H17Rik,  
 Tmem131, Sh2d3c, Gtpbp8, 1700030C10Rik, Polr3b, Fam69a, Bcan, 4930465M20Rik, Sbpl,  
 Emg1, Aaed1, LOC102633315, 5930430L01Rik, Adsl, Foxp1, Gm20337, Trdmt1, Gm9920,  
 Foxo1, Olfm13, Fyb, Pgpep11, Nsg2, Tex26, Fancc, Cngb1, Rapgef2, 2010010A06Rik,  
 2410007B07Rik, Lbh, Pnrc1, Lad1, Mycn, Abhd15, Cd1d2, 4930428G15Rik, Hnrnp11, Dnaja2,  
 Ccr7, Mmp15, Neto2, Bach2os, Efr3a, Rnf41, Mir7656, Znrf3, Rtkn2, Sesn1, Zp3r, Glrp1, 40

Kdm7a, 3200001D21Rik, Pdss1, 5730403I07Rik, Mmp15, Thrb, Zbtb16, Vkorc1,  
 E330009J07Rik, Dntt, 4933406J10Rik, Sim2, Lgals9, Gm12216, Grb10, Ednra, Fam3c, Birc6,  
 Bace1, Sfrp2, 2010107G12Rik, Zfp184, Ctso, Zfp462, Abcb1a, Gm6639, Mir1258, Dyrk1b,  
 Ralb, Thrb, S100a6, Gm590, Dnajc1, Zfand3, Blm, Ikzf2, Lrrc32, Nsg2, Foxp1, Tnpol, Zfat,  
 Specc1, Snora75, Vps45, Acp6, Syde1, Extl3, Fbxl14, Cdh26, Celf2, Cd2, Tshz2, Cntln,  
 Fam65c, Dad1, Akap6, Gm15880, E330011O21Rik, Kdf1, Gstt1, 2700046G09Rik, Sort1,  
 Nyap2, 1700063O14Rik, Cog6, Extl1, Vmn2r96, Il12b, Lclatl, A430107P09Rik, Zkscan16, 10  
 Chl1, Nck2, Cdy1, St6gal1, Mir21c, 2810428I15Rik, Cnr2, Rab44, 1700064J06Rik, Zfp191,  
 Peli1, Als2cl, Gnas, 2300005B03Rik, BC033916, Cd226, 1700049E22Rik, Nipal1, Gimap6,  
 Gm5086, 8430436N08Rik, Ift80, Zfp697, Svs1, 4930459C07Rik, Epcam, Zfp706, Pde11a,  
 Slc43a1, Slc9a9, Tshz2, Fbxw11, Mir7046, Zpbp, 1700123O12Rik, Slc16a1, Gm7457, Tcf4,  
 Fbxl12, Il9r, Galnt6, Gm5868, Panx1, Hs3st5, Jarid2, Phxr4, Dock2, Nrip1, Laspl,  
 1700066B19Rik, Marcks, Plekha7, Wdr41, Pdss2, Gpr83, Rapgef4, Gm15910, Colq, Olfr1507,  
 Vgl14, Fgfr1op, Fanc1, Capn1, Lonp2, Rnf38, Gpaa1, 1700016G22Rik, Vmn2r98, Gm7325,  
 Gm826, Rpl31, Klrc1, Ikzf1, Crlf3, Cd44, Gypc, AU019990, Fbxl13, Tsc22d3, Tgm2, Ptpn14, 20  
 Fance, Arhgap26, Tgfbr2, Klf2, Sept7, Ptprc, Btn2a2, 4921511I17Rik, Ppp2r5a, C78339,  
 Arhgap39, Ism1, Mpzl2, 2810459M11Rik, Dyrk2, Tspan13, Fbxl14, Plat, Celf5, Susd3,  
 Rps6ka2, Gtf2ird1, Naif1, Rsph3a, Tssc1, Ext1, Snora7a, Bcl2l11, Pip4k2a, Npl, Tmem236,  
 Cox7a2l, A530013C23Rik, Rgl1, Pgk1, Ift80, Emid1, Inpp4b, Cldn10, Glis, Tnni1, Folr4,  
 Gm5766, Olfr1507, Hpcal1, Cyth4, St8sia6, 5430434I15Rik, Ropn11, Serinc1, Mad2l1,  
 4921525O09Rik, A430107P09Rik, Gm11127, Tra2a, Urb2, Pgpep11, Cacna1d, 5730403I07Rik,  
 Fam49a, 1700025F24Rik, Stat1, Calm1, Kcna7, Eif1, Mir669m-2, Kdr, 1700123O12Rik,  
 Mir8099-2, Hspa8, 2010010A06Rik, Zfp53, 4930524O05Rik, Abl1, Uvrag, Slc16a1, Dnah7b, 30  
 Golph3, Ipcef1, Usp3, Jun, Snord89, Tcf7, Rbpms, Folr4, Papss2, Spred2, Stpg1, Mgat5, Lpin1,  
 D8Ertd82e, Dhx40, Slit3, 4933405E24Rik, Nsun6, A430107P09Rik, Apol7e, Raly, Celf2,  
 Ndufs7, Mir6921, Kbtbd11, Gc, Haao, Gm9054, Slc44a3, Tnfrsf19, Lef1, Ankrd11, Plxdc1,  
 A430107P09Rik, Zcchc2, Zmat4, Jun, Adamts14, Slamf6, Adamts17, A430107P09Rik, Alox5ap,  
 Mir6368, Ncor2, Ets1, Pmpcb, Mvk, 4922502D21Rik, 1700025G04Rik, Rgmb, Gpnmb, Stk17b,  
 Ceacam9, Ttc1, E130006D01Rik, Camkmt, Ankrd63, Agtr1b, Khdrbs1, Zfp706, Cux1,  
 4922502D21Rik, Btbd1, Timm8a2, Itga4, Reep2, Uvrag, Cyfip2, Elovl6, Tfeb, Spag16, Tbccl,  
 Lmo2, Rasgrp1, Fam86, Ktn1, Fbxo32, Gata3, Ly86, Ptgs2os2, Fam111a, Lrrc16a, 40

B430306N03Rik, Tff3, Kcnn4, Mtif3, Ldlrap1, Tmem260, Pla2r1, Basp1, Ncoa3, Ngly1,  
 Ccdc162, Nhsl2, Cdc123, Hnrnpu, Arhgap18, Zf12, Gm6498, Bex6, B630005N14Rik, Dynlt1b,  
 Lypd6b, Clec2e, Rbm17, Pstpip1, Lrp12, Akap2, Camk2d, Igf1r, Atpl1a1, Gsn, Rragd, Actn1,  
 Odf3b, Nudt4, Vmn2r99, Parp11, Adipoq, Fam221a, Il6ra, Kif23, Fabp5, Srpk2, Ikzf1, Fbxw7,  
 Slamf9, St6gal1, Vav1, Serbp1, Reep1, Agr3, Plcl2, Kcnj15, Aebp2, Gm20139, Mtx2, Sel1l,  
 Mbnl2, A430078G23Rik, Krr1, Lclat1, Zfp438, 4930487H11Rik, B4galt1, Ifngr2, Olfr221,  
 Asb4, Gm6793, Ap1m1, Pdlim5, Gltscr1, 1110032F04Rik, Ankrd13a, Abcd2, Iqsec1, Inpp5a, 10  
 Pdzn3, Akirin2, Pip4k2a, Dyrk2, Jun, 4930465M20Rik, Osbp19, Ttc30a1, Ctnnbl1, Tmem243,  
 Olig3, Ubtd2, 4930540M03Rik, Dnajc5b, Dennd1a, Gadd45a, Rpl8, Dapl1, Cd2ap,  
 6430710C18Rik, Slc16a5, Rcbtb2, Hmgxb3, A630075F10Rik, Ankrd2, St8sia1, Ptk2b, Paqr8,  
 Tox, Wdr37, Stat4, Rplp1, Ccnj, Hspbp1, Mthfd1l, Zcchc9, Gm13293, Camk4, Htt, Usp10,  
 Plekha6, Gm5617, Cnksr3, Mir7218, Lcp2, Cd28, Lbp, Ncoa3, Skil, Hey1, Mir6368, Akap6,  
 Spin1, Ccdc174, Stambpl1, Ggta1, Pifo, Stim2, Rras2, Tomm20l, Gm5538, Skap2, H2-Ob,  
 Zfp36l2, Clec2d, Erdr1, Dapl1, Vasp, Cytip, B4galnt3, Hamp, Mex3b, Tcf7l2, Vps13d, Alox5ap,  
 Mtss1, Gm7457, Fam46a, Taf3, 2810408I11Rik, Ms4a7, Mad2l1, Selt, Snrpf, Hcn2, Frmd4b, 20  
 Hivep1, Tspan13, Nfia, Asap1, Nt5e, Misp, Maml2, Sh3pxd2a, Ccdc162, Setd7, Etoh1l, Acvrl1,  
 Fntb, Shank3, Rhoh, Prok2, Marcks, A830010M20Rik, Ywhaz, Mtss1, Gm8369, Fam188b,  
 Atp2a2, 4933405E24Rik, 4932443I19Rik, Notch2, Zc3h12b, Numb, Neb, Ramp1, Zfp831,  
 Impdh2, Grk1, 4930459C07Rik, Mir7035, Setd3, Cdc42se2, Spo11, Fam166b, Mir6419,  
 Atp10d, C2cd5, 4933412E24Rik, Boll, Calr4, Il22ra2, Slc22a16, Syde2, Fyn, Slc27a6, Stx3,  
 Gm6313, Rbm18, Gm13293, Tbc1d8, Fabp5, 4930546C10Rik, Slc16a1, Cnr2, Kenip2, Trim69,  
 Agbl1, Plvap, Ms4a6c, Usp38, At12, Sh3kbp1, Ppfibp2, Pim1, Pmis2, Sh3pxd2a, Ms4a4c, Klf3,  
 Cblb, Mir701, Dmwd, Mtss1, Cdkl3, Cabp2, Chdh, Pde4b, Ston2, Cmah, Fbxl14, Syk, Trio, 30  
 Btg1, Ski, Cnot2, Stk38, Tm9sf3, 4930482G09Rik, Parp11, Jarid2, Maml3, 6430710C18Rik,  
 Commd9, Fhit, Scamp1, Tcf7, Ncf1, Ric8b, Gm3716, Scml2, Nr2f2, Ssr1, Il6st, Ankrd50,  
 Pnmal2, Foxp1, Raver2, Ccdc64, 8430436N08Rik, Klf13, Itga5, Commd3, Mro, Ms4a7, Rock2,  
 Enc1, Rab3gap1, Nav2, Tlr1, Gm7457, Elfn1, Rpl34, Agfg1, 1700020N01Rik, Irf4, Gm8369,  
 Olfr1507, Grik4, Akap6, Mir6387, Thrb, Gm20110, Mir7670, Bag4, Gm15441, LOC101055769,  
 Pak1, Mbd2, Ralgs2, Lipg, Gpnmb, Ubash3b, Kntc1, Aqp9, Znrf2, Cmah, Peli1, Chd7,  
 Tmsb4x, Copb1, Gimap1, Bcas1os2, Ppapdc1b, Cdc14a, Ier5, Susd3, Birc2, Sun2, Itga5, Rlbp1,  
 St8sia1, Hectd1, Chn2, Bcas1os2, Slc39a11, Cdc7, Me3, Stk17b, Ccr4, Peli1, Cd226, 40



2510009E07Rik, Sh2d1a, Zfp2, Mei4, Chst2, Nipal1, Tbccl, Itgb6, Tmed10, Gm4489, Tmcc1,  
 A430107P09Rik, Abtb2, Tgfbr3, Zfp704, Reep5, Apccdd1, Pik3r1, Msl2, Gm20098, Eif4e3,  
 5430402O13Rik, Tssc1, Lphn2, Kcnh8, 4921525O09Rik, Fam46c, Pum2, Itsn2, Slc11a2,  
 Usp6nl, Gimap6, A430107P09Rik, Nipbl, Nrnx3, 1700042O10Rik, Capn3, 4930526I15Rik,  
 Plat, Gm15850, Dock10, Shisa2, Wbscr16, Egfl7, Zfp957, Gm20110, Slc4a8, Ago2, Pnp2,  
 Tgfbr3, Hmga2, Pdlm7, Dip2c, Atp1b1, Pxx, Snora26, Gm6498, Sema3d, 3300002I08Rik,  
 9330175E14Rik, BB123696, Fibcd1, Slc6a19, S100a6, Commd9, Lpar4, Cntn5, Nr1i2, Panx1,  
 Dock2, Ptovl, 5330411I11Rik, Sec24d, Ms4a4b, Eif3g, Rsbn11, Plxnc1, Jarid2,  
 1810041L15Rik, Diap2, A630075F10Rik, Klf13, Tlk1, Lef1, Slc4a4, 2610020H08Rik, Tbce,  
 9430014N10Rik, Slc16a10, 2310042E22Rik, Lrrc3b, St6gal1, Tnfrsf1a, U90926, Fam134b,  
 Grxcr2, Dok5, Aldh8a1, Cybrd1, Smarcb1, Jmy, Zfp608, Cdkn2aipnl, Aire, Prps2, Gm839,  
 4933412E24Rik, St6gal1, Ube2d2b, Mab21l1, Slc23a2, Keap1, Brdt, Piwil2, A930005H10Rik,  
 Fyb, Ncald, Lgals9, Zfp704, Dguok, Gm15706, Nr3c1, Med13, Rictor, Paxbp1, Mir1903, Sv2a,  
 Slx1b, Tbc1d24, Wnt5b, Ccr7, Ptk2, Mir21c, Aox4, Slc35b4, Mgat5, Zfp281, Mycn,  
 1700016G22Rik, Odc1, Prkcb, Atel1, Ncbp1, 3300002I08Rik, Ly6d, Spag16, Clk1, Atg10,  
 1700030L20Rik, Nsg2, Agps, Golt1a, Cntn5, Cadm4, Malsu1, Frmd4b, Gm6607, Cdh23,  
 Gramd4, Slc44a2, Limd2, Lphn2, 1700010K23Rik, Lrrc66, Akap7, Pea15b, D030024E09Rik,  
 Zscan10, Lsm2, Kcnj13, Cdhr3, Fbxl17, Lhx2, Olfm2, Cyp2r1, Wisp3, BB123696, Nlrc4,  
 2010010A06Rik, Elovl6, Eea1, Mir1907, Glis, B4galnt3, Epb4.1, Tshz1, Gpr126, Rgmb, Ncs1,  
 Tet1, Hoxa1, 4930515G16Rik, Usp33, Stk10, Klhl6, Ccdc109b, Manba, Gm5111, Chst15,  
 Runx1, Rgs3, Gm4759, Ldlrad4, 4933400F21Rik, 4933406C10Rik, Diap2, Mir6403, Plin2,  
 Zmiz1, Maml3, Fam86, Hbs1l, Inpp4b, Gm14405, Mgat5, Cntn5, Ramp3, Ifnk, Pgm1, Mfsd6,  
 Armcx1, Mir5127, Gimap6, Mir6387, Slc38a2, Gsdmcl-ps, Cd24a, Kmt2e, Csrp1,  
 9530052E02Rik, Stk17b, Fyb, Lhfpl5, Atp8a2, Amn1, Sertad2, Epb4.1l2, Stk24, Cdk17, Camk4,  
 Rpa1, Zmynd11, Efcab11, Mir491, Zc3hc1, Vps45, Rgs3, Ube2m, Tspan5, Insr, Snapc1, Btg1,  
 Cox10, Znrf1, Camk4, Ddr1, Gm11981, Sesn1, Commd8, Nrip1, Polr3k, Eya3, Ppp1r1b, Pcdh7,  
 A430107P09Rik, Efcc1, Mtss1, Hpn, Armcx1, Gm20139, Alg14, Sec11a, Cyb5d1, Trpm1,  
 Fam65b, 5730508B09Rik, Frmd4b, Gm10584, Gm5069, Pmepa1, Sell, Mir6413, Klf12, Rhoq,  
 Plcl2, Prrc1, Emp1, D030024E09Rik, Rnf145, Bach2, Prkcq, Hic1, Msmo1, Map3k7cl,  
 AI854517, 4922502D21Rik, Vtla, Zcchc9, Spats2, Mir7681, Wdr89, Bcl6, Cytip, Gm13293,  
 Creb3l4, Peli1, Pak1, Efcab11, Usp7, 4931403G20Rik, 1700030A11Rik, Mvbl2b, Ampd3,

10

20

30

40

Cubn, Baiap3, Med30, Actbl2, Kat6b, Peli1, Tmevpg1, Nsf, Hpcal1, Ube4b, Fam110b,  
 C330011F03Rik, Inadl, Sesn3, Tmem30c, Itgb6, Dlg1, Srp14, 3300005D01Rik, Ggact, Mir21c,  
 Cyp2s1, Mir7061, Bach1, Insr, 2410114N07Rik, H2-Eb1, Tasp1, Tusc3, Irf2bp2,  
 1700056E22Rik, Ppp6c, Slain2, Cnn3, 6030407O03Rik, Acbd6, Hmgb1, P2rx4, Cdk19,  
 1700061G19Rik, Tesk2, Plxnc1, Ercc3, 2010010A06Rik, Stk17b, Tspan9, Kcnj16, Ddx10,  
 Wnt16, Sp4, Hilpda, Slc38a6, Tgfbr2, Fggy, Sugct, Begain, Mnd1-ps, Ksr2, Eif2d, Ms4a4d,  
 Stim1, Cst10, Nfatc1, Ppifos, Gng7, Mir211, Txk, 4930415F15Rik, Tmem64, Stim1, Pip5k1b,  
 Kcnj15, Commd8, Mir3108, Atp11b, Stk17b, Emc3, Cldn10, Akap13, Abcb1a, Mthfd11, Foxk1,  
 Rgs3, Gdnf, Micu1, Il7r, Arhgap35, Olfr1364, Ms4a4b, Rgs10, Flt3, Sfrp2, Il9r, Sf1, Gm1604b,  
 Galnt4, Dtnb, Supt20, Fntb, Zmynd11, Tulp3, 2410007B07Rik, Tsen15, Abhd2, Dgcr6, Filip11,  
 Ift81, 4933401D09Rik, Gtdc1, Ano6, Mir1928, Peli1, Jak1, Cdk19, Syne1, Il23r, Tpm2,  
 Fam65b, Kidins220, Vav1, 9030617O03Rik, C1ql3, Ceacam9, Ehd2, Vtcn1, Dusp7, Pik3ip1,  
 Ostml, Ppard, Olfr372, Mir7032, Npy, Phxr4, Grap2, Thrb, Wipi1, Dock4, Mfsd6, Zmynd8,  
 Mylip, Setx, Ccdc146, Il12a, Sall3, Mir7048, Hapln1, Casp3, Bbs9, Syne1, Tdrd3,  
 4930565D16Rik, Gm20098, Tcf4, Haao, Snd1, Zfp706, Agfg1, Gm8709, Syne1,  
 4933406J10Rik, Pik3c2b, Manba, Olfr1033, Aurkb, 9330175E14Rik, Foxo1, Sfmbt2, Bach2,  
 Pogz, 4930459C07Rik, Phxr4, Map7d2, Gm20750, Il12b, Sesn3, Psen2, Suco, Mad2l1,  
 E030030I06Rik, Gadd45a, Abca1, Boll, 4930430F21Rik, Cstad, Lyst, Rasgrp4, 4833427F10Rik,  
 Ehd2, 4930445N18Rik, Ppm1h, Gltscr1, Irf8, Lgi1, Gm10432, H2-M10.1, Crtc3,  
 4930453N24Rik, Irs2, 1700042O10Rik, Rabgap11, Rnf144a, Csk, Rpia, A430090L17Rik,  
 Mir8097, Serbp1, Mir684-1, Tcf4, Commd8, Tet3, Nr1i2, Gm10190, Prkceq, Orai2, Dpy30,  
 Sbk2, Tssc1, Cd5, Sipa1l2, Dcp1a, 1810006J02Rik, Itgae, D030025E07Rik, Wibg, Bach2, Irf4,  
 Ctnnd1, Usp7, Rftn1, Themis, 4930440I19Rik, Thrb, Nr1d2, Tgtp1, Ccdc162, Atp8b2, Speer4f,  
 Stra8, Gm4906, Fam46c, Pag1, Etv3, Erdr1, Dhrrsx, Fam65b, Gosr1, Trem2, Fbln1, Sp3, Mef2a,  
 Bcor, Map4k4, Magi2, Pak2, Rph3al, Lgi4, Pja2, Tceal3, Efcab11, Arhgap5, Ext1, Smyd3,  
 Prim2, Satb1, Stag2, Themis2, Pim1, Apol8, Lrrc6, Shb, Magi2, Commd8, Zfp879, Trp53i11,  
 Rgl1, Abcd3, Diap2, Zbtb2, C030016D13Rik, Arhgdib, A630075F10Rik, C730036E19Rik,  
 Phc2, Adamts10, Inpp4b, Cd200, Itpr2, Fgfr1, Gm5434, Scn2b, D8Ert82e, Gm2a, Ube2v1,  
 Bend4, Lpp, Mir181a-2, Gm13293, P2ry1, Klf7, E030018B13Rik, Rhobtb2, Ddr1, Ggnbp1,  
 Gimap7, Mamstr, Cmip, Setbp1, Fcgr4, Slc1a3, Zfp608, 2810403A07Rik, Gm7538, Mir378a,  
 Hoxa13, 2610301B20Rik, Ngly1, Sergef, Tpp2, Slc35b3, Maml3, Nav1, Txk, Fam195a, Scml4,

10

20

30

40

Tlr12, Gpr125, Zfp3612, Suclg2, Tec, Akap2, Rab38, C030018K13Rik, 4933433H22Rik,  
 Osbpl11, Capn13, Ankrd50, Mir1928, Mir3108, Slc39a10, Dock2, Dip2c, Aebp2,  
 A530046M15Rik, Gm6251, Mtx2, Exoc4, Olig3, Dph6, Emb, Xpc, Gm7538, Tnfsf8, Afap112,  
 Cenpv, Gsn, Rbms2, E2f3, Smarcel, Foxp1, Slc37a3, Apbb1p, Tex10, Bend4, Pcgf5, Trio,  
 Klf5, Gja8, E130006D01Rik, Ncor2, Acbd6, Alg14, Scmh1, D830013O20Rik, Galnt4, Ndufa6,  
 Timm8a2, 2210010C04Rik, 4931403E22Rik, Gys2, G630090E17Rik, Dapl1, Nup160, Fxyd7,  
 Zscan18, Bid, Serhl, Cdk17, Lrtm2, 3930402G23Rik, Tm2d1, Snora7a, C8g, Nkap, 10  
 2410007B07Rik, Ilf3, Mir7017, Gpr83, Thada, Ambra1, Fancc, B3galt4, Thns11, Etv5, Aox2,  
 Tgm2, Man1a, Edem1, Hnrnp1, Atp6v0e2, Clec4f, Hey1, Fam3c, Stat4, Slc46a1, Rps15a-ps6,  
 Kdm4c, Upb1, Sik1, Nceh1, Prkcq, Btg1, Galnt2, 2010010A06Rik, Neu3, Cubn, Mir1928,  
 Rapgef2, Nedd4l, Egfl7, B3gnt2, Tgtp2, Gm13546, Ext1, Pold4, Ggact, B3gnt7, Gm5868, Tlr7,  
 Lefty2, Npff, Tcf7l2, D130058E03, Pag1, 4930578N18Rik, 6430710C18Rik, Fam43a, Snora81,  
 Cyp20a1, 4922502D21Rik, Lsm1, Gm10791, Kcnh2, 1700109K24Rik, Nol6, 4922502D21Rik,  
 Trib2, Nrf1, Rgag4, 4930426L09Rik, Ppil3, Vmn2r96, Ngly1, 1810046K07Rik, Hid1, Olfr1510,  
 Nrip1, Dhtkd1, Ms4a6b, 4930583K01Rik, Atp1b3, Mir7046, St8sia1, Pcdh7, Micalcl, 20  
 D030024E09Rik, Pold4, Coro2b, Adamts14, Auh, Fus, Hcls1, Prkcq, Nim1k, Zdhhc14, Kcnh2,  
 Cd37, Ttc27, Olfm2, Ubac2, Mir6387, Zfp619, Zbtb9, Gpr125, Ppp2r5a, Adgb, Pard3, Ctrl,  
 Ddr1, Ckmt2, Lpar6, Sspn, Gm4792, 9430008C03Rik, Ngly1, Tbx19, Heatr1, Cdc14a, Nabp1,  
 8430436N08Rik, Cd247, Llp1, Pex10, Eea1, Lef1, Ly75, Dock11, Haao, Rgs3, Mnd1-ps,  
 Maml1, Stxbp1, Parp11, G530011O06Rik, Mgrn1, Ift57, Mef2a, A1427809, Ldhhb, Cdk19,  
 Lrrc3b, Osm, Dnajc15, Mirlet7i, Stk38, Cep170, Rcn3, Gramd1a, Mfng, Vgll4, 1700017N19Rik,  
 Atp1a3, Ptpla, Mir6962, Jun, Cdk19, Gm10638, Zfp3612, Slc39a10, Tpd52, Mthfd11, Agbl1,  
 4922502D21Rik, Ceacam2, Drosha, Fut8, Cox10, Dnajb12, Thns12, Eefsec, Pgpep11, 30  
 4932441J04Rik, Fndc7, Clip1, 2700046G09Rik, Itpkb, Kremen1, Mpp6, Ccr9, Tbc1b, Rictor,  
 Gm3716, Icosl, Cpeb4, Mir7681, Kmt2c, Mak16, Gli1, Actl9, Gpatch2, Sept14, Aebp2, Phlpp1,  
 Zfp957, Ap3m2, Zcchc2, C030018K13Rik, Cdk17, Tmem217, Cog6, Dock2, Il7r, Crybb2,  
 Slc16a10, Ppp1r1b, E430016F16Rik, Fbxo17, Akr1d1, D10Jhu81e, Irgc1, Klf7, Pcdh7, Nipbl,  
 Rrn3, Mir7681, Arhgef33, Rhoq, Dusp5, Itga4, Palm2, Map10, Tigd2, Mfge8, Zfp580, Peli1,  
 Trim59, F730035M05Rik, Gpr110, Lyst, Slc10a4, C230029M16, Gpnmb, Rgs3, Rab3ip, Vps54,  
 Cox7a2l, Slc7a15, Serbp1, Slc22a16, Prkch, 4933433H22Rik, Arap2, Mkl1, Slc22a16, Fli1,  
 Stk24, Stard8, Arhgap29, Pcca, Trem12, Tssc1, Pgpep11, Syde2, A430107P09Rik, Foxo1, 40

8430436N08Rik, D030024E09Rik, Tcf7, Ifitm6, Ctso, Capzb, Lypd3, Lix1, Ccdc170, Tasp1,  
 Dnah7a, Sugt1, Pde7a, Pcnp, Klf5, Olfr1357, Ldhal6b, Kctd12b, Cxxc5, Pkn2, Mboat2, Angpt1,  
 N6amt2, Gm839, Bach1, Il2ra, Ankrd12, Ccdc64, Pptc7, Ikzf2, Svil, Tlr1, Rel1, Tma16, Mbn11,  
 Cyfip2, Rps6ka2, Elovl6, Dapl1, Zfand3, Unc5cl, Zfp619, Sytl3, BC031361, Fam26e, Gm2799,  
 Chst15, LOC101055769, Sepp1, a, Ccdc171, Hemgn, Pik3c3, Lrp12, Capn11, Pvr, Prkcq,  
 4932702P03Rik, 2300002M23Rik, Tef, Foxp1, Lypd6b, 4933412E24Rik, Wnt4, Marco, Elfn2,  
 Smim9, Dip2b, March2, Frs2, Olfr1507, Mir7219, Fbxl22, Vim, 4933432G23Rik, L3mbtl1, 10  
 Mad111, Calr4, Lrrc3b, Strada, Mir363, Tspan9, Esrp1, Panx1, Tgfbr2, Emb, Spata3, Ext1,  
 Calm2, AY512915, C530008M17Rik, Mitf, Wdr11, Mir5127, Selt, Gm6623, Gm684, Gm3716,  
 Tgtp2, Sptb, Hamp2, Itgb6, Cd2ap, Prnp, Ift80, Slamf6, Pou2af1, Snx29, G530011O06Rik,  
 Wipf2, Fam134b, 4930428G15Rik, Igl11, Phxr4, Sgms2, Gm12159, Igf2bp3, Haa0, Bai2,  
 Sh3pxd2a, Scn4b, Eif4e3, Snx29, Tmem194b, Ifngr2, Gm5766, Zcche24, Sox5os3, Efna5,  
 Tecta, Mir7687, Mir6367, Itga4, Tns4, Ccm2, Wipf1, CerK, Znrfl, Elovl5, Phtf2,  
 1300002E11Rik, 2210417A02Rik, Mir7061, Grhpr, Mark4, 4930564C03Rik, Svopl, Pja2,  
 Tfdp2, Rbm11, Usp6nl, Mir6368, A430107P09Rik, Bcl2, Cdc42se2, 4933433H22Rik, Apol8, 20  
 Xpnpep2, Dach2, Mir205, Stard5, Fsbp, Rph3al, Vav3, Gm10125, Lpcat1, Cd2ap, Bank1,  
 Smurf1, Aox2, C230029M16, Sgms1, Eci3, Xpnpep2, Pfkfb2, Utrn, Ldlrad3, Gabrr1, Kcna2,  
 Ywhaz, Stard13, Atp10a, Slc39a10, Whsc111, Gm12522, Trio, Man1c1, Hmha1, Gm10791,  
 Kidins220, Lad1, Mir1928, Gm13710, Mir1963, Lama4, Pard3, Susd3, Taok3, Skor2, Matn2,  
 Tet2, Mir7674, Ccdc64b, Fam49b, 4933412E24Rik, Thsd1, Sall3, Papss2, Tceal3, Rreb1, Klrd1,  
 Rgs3, Cst10, Itga4, Gm20098, Smarca4, Cyp2d22, Kdm6b, Cntn5, Dyrk2, Dusp10, Srpk2, Etv5,  
 Slc25a25, Cfl2, Micu1, Ets1, Gm6559, Zfr, Mrpl52, CerK, D630010B17Rik, Ext1, Cblb, Gnai2,  
 Apol7e, Manba, Dusp10, Smim8, Mir6907, Pard3, Tmem35, Ric8b, Gm14124, Pik3r1, 30  
 Gm11981, Dip2c, Plin2, Fam228a, Tlr1, Lypd6b, Zc3h12b, Abcg1, Ext1, Camk2g, Ptgr2, Mnd1-  
 ps, Rftn1, Sox8, Sdc3, Mab2113, Arid1b, Tdrp, 4921525O09Rik, Arid4b, Micu2, Ly86, Afp,  
 Grap2, Ist1, Sh2d4b, Rad52, Mir1668, Rpgrip11, Gramd1a, Sgk1, Fos, Smad4, Hdac4, B3gnt3,  
 Nr4a3, St8sia1, Psg-ps1, Actl9, Pdk1, Il2ra, Irf2, FasI, Hsdl1, Galnt5, Itk, Maml2, Erdr1,  
 Ndufa6, Tbc1d23, Slc43a2, Iqgap1, Klf7, Bend5, Klf4, Lif, Calr4, Cnst, Ifnk, G3bp2, Tbc1d2,  
 C030034L19Rik, Zfhx3, Bcl11a, Retnlb, Ap3m1, Hlcs, Serpinf1, Gm16390, Wdr37, St8sia1,  
 Cenpu, Gm10638, Tfpi, Fabp7, Wisp3, Psmal, Tet2, AI854703, Lmo4, Ppp1r1b, Mgat5, Foxp1,  
 Gm3716, Mir6349, Tle4, Itgb8, Rab11fip4, Tbccl, Npepps, 1300002E11Rik, Celf2, 40

4933412E24Rik, 4930415F15Rik, Olfr1507, Itgb3, Bace1, 2010015L04Rik, Mir7656, Esrp1,  
 Spred2, Myo10, A930001A20Rik, BC048403, Lincpint, Mturn, Shisa2, Mef2d, Rac2, Dusp6,  
 Lef1, Tmem64, Lrig1, Atp6v1g1, 1700017N19Rik, Dfna5, Zfp286, Gimap9, Gbe1, Cdc37,  
 Pard6g, Serp2, Pid1, 4930465M20Rik, P2rx4, Opalin, Mir684-1, Ngly1, Ndufa4, Mir16-2,  
 Trib2, Slc17a9, Itpril1, Uri1, Rnf32, Prlr, Lym7, Fbln1, Nenf, Atl2, Slfn1, Supt20, Ski, Pno1,  
 Foxo1, Olig3, 5330411J11Rik, Eci3, Clic4, Naa30, Abca1, Mpp1, Adcy6, Ptpre, Fbxo27,  
 Ahcy12, 1700016K19Rik, Gm14405, Drosha, Lrrc1, Mir7014, Cdk19, Ldlrap1, Pgpep11, Fgl2, 10  
 Nck2, Acvr2a, Myo10, Cblb, Gm590, Kenq5, Col6a1, 4930480M12Rik, Rad23b, Tram2, Pygo1,  
 Mir6368, A430107P09Rik, Afap1, Pip4k2a, Slc46a2, Mgat5, Slc27a6, Ntper, Cuedc1, Ramp1,  
 Enthd1, Mir6374, Stmn1-rs1, Gm684, Fbln1, Lef1, Chd7, Ppp1r3fos, Abi1, Plau, Aif11, Tesc,  
 Edem3, Tbccl, Prdm5, Lnpep, Dyrk2, Gm6260, 4930428G15Rik, Carns1, 8430436N08Rik,  
 Plekha5, Hexim2, Ccr7, Foxp1, Satb1, Rpgrip1, Dnm3os, Retnlb, Tram1, Tmppe, Car12,  
 Snord14c, Ets1, Crtc3, Kenh8, Hey1, Slc44a2, Dip2c, Ankrd44, C230029M16, Nwd1, Mrps11,  
 Cpb1, 4930567H12Rik, Mir378c, Dnaja2, Fnbp11, Tab3, Zap70, Cenpk, Bcar3, Usp6nl, Ppp4r2,  
 Has1, Tbc1d22a, Dync2li1, BC055111, Sepw1, Ap1s3, Ass1, Metrnl, Rsph3a, Dpysl2, Rapgef6, 20  
 Cxcr4, Mir8095, Sgsm3, Actn1, Grb10, Slpr1, Rasgrp1, Dnajc6, Agfg1, Map3k15,  
 4930465M20Rik, Csnk1g3, Trpv5, Klf3, Zfp3612, Mir181a-1, Slc30a9, Taf3, Eml2, Tssc1,  
 1190002N15Rik, Cdh26, Sav1, Ghsr, Msra, Fam134b, Tusc3, Itpkb, Dtw2, Frmd7, Gm20750,  
 4933440M02Rik, St8sia1, Mir8105, Mir7681, Sntg1, Hipk2, Cd8b1, Stk24, Zmat4, Pnoc, Creb1,  
 Trps1, Glis, Gm15706, Ubtd2, Kif1b, Pex3, Ect2l, 4732490B19Rik, Calm2, Syne1, Ap1b1, Ldha,  
 Mmp15, Tnks, Gm20098, Spred2, Igfbp3, Atp1a3, Pdzn3, Qser1, Ppm11, D930032P07Rik,  
 Vmn2r98, G530011O06Rik, Ikzf1, D630010B17Rik, Mettl8, Gm590, Enthd1, Cedc152, Ywhaq,  
 Atp8a2, Thra, Ildr1, Rpap3, Ltb, Rev3l, Med13l, Dner, Ralgps2, 4930428G15Rik, Dnajc1, 30  
 Arhgap6, Fam101b, Nfam1, Ccr7, Psma6, Gm1631, Hadh, 3425401B19Rik, Irf4, Zak, Brdt,  
 Fam71f2, Slc25a12, Ippk, Fnbp11, Rps16, 4930540M03Rik, Cd5, Ube2e1, A430107P09Rik,  
 Rapgef4, Olfr1507, Rmdn2, Lhfp, Mir1893, Lgals3, Gnl3l, Whsc11l, Sh2d1a, BC061194,  
 Mbnl2, Zbtb38, Golph3, 4930430F21Rik, H2-Q1, Ntrk3, Ninj2, Cd3e, Stat5b, Lbx1,  
 4933412E24Rik, Pten, Gm2447, Mtx2, Tmcc3, Lin28a, Cyb5a, Znrf1, Fancc, 1500015O10Rik,  
 Plekho1, Prss32, Gjd2, Gphb5, Ccr7, 4931403G20Rik, Mboat1, Dyrk2, Il9r, Sos1, Etv2, Txnip,  
 Fam110b, Rph3al, Mboat4, Plekhh2, Irf6, Thoc7, Yeats4, A430107P09Rik, Ms4a7,  
 4930567H12Rik, Zfp930, Zap70, Uaca, Nsg2, Myo10, Ctf1, AU015836, Mir7681, 40

9830132P13Rik, 1700021F07Rik, Ipo4, Icosl, Smad5, Cyp26b1, Mgarp, A430078G23Rik,  
 Kdm6a, I730028E13Rik, Hs2st1, Tox, Akr1d1, 1810010D01Rik, Rpl34, Ramp1, Hcls1, Rab3ip,  
 4930445N18Rik, Extl3, Sox4, Gjd3, Gm14305, 1700061F12Rik, Lnpep, Wnt5b, Mark4,  
 Stmnd1, Olfr1507, A430107P09Rik, Commd8, AI427809, Mir6979, Cdc42se2, Gpr125, Tcf25,  
 Taf8, Lclat1, Wdr89, Ptk2b, Pitpnb, Ttf2, St6gal1, Maml2, Lrch3, 5430427M07Rik, Bach1,  
 Exoc4, Mef2d, Vps37b, Wdr37, Ccr7, Fam221a, Mif, Vmn1r157, Mpp6, Chd2, Sept6, She,  
 Prg4, Snord83b, Gm7616, 2410114N07Rik, Wdr37, Gdpd4, Vdac1, Mir5104, Rsrc1, 10  
 4930523C07Rik, Akap2, Lyst, G6pc2, Klhl4, Slc35b4, Setbp1, Akap2, 1700072O05Rik,  
 Gm1604b, Kcna10, Stambp1l, Npas2, Dnajc1, Ddx25, 4933433H22Rik, Plcg2, 4930562F07Rik,  
 Armc4, Foxo1, Samd9l, Gm16157, Gpnmb, Tmem141, Mir6413, Gabbr2, Fgf8, Prdm2, Ikzf3,  
 Diexf, Ccdc8, Esd, Macrodl, Tm2d1, 4930572O13Rik, A130077B15Rik, Lck, Kdm2a, Rbbp8,  
 Cd47, Gm6578, Klf2, Zfp536, Ube2e3, Aff3, Man1a, 4930413G21Rik, Crtam, Rpa1, Kcnh3,  
 2900008C10Rik, Tbc1d31, Snn, Malat1, Bambi-ps1, Wisp3, Mrgprb5, Gch1, Nabp1, Mettl9,  
 Zfp3612, Mir7669, 4933401H06Rik, Prkrir, Erdr1, Olfr630, Tmem168, Gbp11, Mbnl1, Plin2,  
 Scn2b, Car8, Ngly1, Kcna2, Dpp6, BC027231, Gosr1, 1700016L21Rik, Ccdc170, Manba, 20  
 Osbp19, Purb, Rftn2, Klf3, Cdca7l, Supt7l, Rgs3, Rbpms, Mir6349, 5830418P13Rik, Pkn2,  
 Basp1, Btg2, Ifnk, 5730403I07Rik, Srsf1, Kif3a, Fbxo27, Gipr, Colq, 4930540M03Rik, Pard6g,  
 Bcl11a, Ezh1, Cd2, Foxq1, Rybp, Pgap1, Usp10, Sh3bp5, Pmp22, Sdc3, Rnf145, Ankrd44,  
 Tacc2, Sh3bp4, 4930465M20Rik, Slc19a3, Gm10791, Map4k4, Bhmt, Gm10190, Zdhhc18,  
 Mroh2b, Gpr3, Tgfbr2, Reck, Atxn7l3b, Ngly1, Il12rb1, Gucy2c, Gpr83, 1700025G04Rik,  
 Arap1, Chrm3, 8430436N08Rik, Postn, Lonp2, Ly6d, Zfp516, Fam102b, Psap, Rere, Fam217a,  
 Cox4i1, Slc7a1, C9, Mir6374, Mdm1, 2310043L19Rik, Fbxl17, Gm5468, Panx1, Sct, Racgap1,  
 Ppm1b, Samd12, E330009J07Rik, Cd101, Zcchc2, Gadl1, Rapgef6, Steap3, Fgfr1op, Setd7, 30  
 3110056K07Rik, Gm5538, Ino80e, St6gal1, Nsmce1, Ccdc64, Cxcr4, Gata3, Cerkl, Chst15,  
 Mir3089, Map4k4, Akap13, Slc30a9, Gm10790, Npffr1, Tdrp, Gm20098, Ddh2, St8sia6, Lhx2,  
 Syt6, Dtl, Themis, Maml2, Sh3bgrl2, Sptbn1, Fam207a, Lmna, Nfatc2, Gm12185, Arhgap6,  
 Atg14, Macrodl, Mir3110, Fam46c, Wdr63, Ppp2r1b, Prdm9, Lphn2, Mir574, Il9, Elovl6, Chd7,  
 Pitpna, Atoh7, Mc2r, Celf2, Tdrd3, Rassf2, Gm10640, Ncoa3, Lyst, Fyb, Gm2447, Aplar,  
 Stag2, Foxp1, Rock2, Pdlim1, Bin1, Gm10125, Bach2, Fbxl22, 2900005J15Rik, Rgs2, Cldn10,  
 Lrrc8d, Rad23b, Supt20, Dgkd, Atn1, Agtr1a, Pias2, Gm10791, Tmem60, Prkag2, P4ha2, Trat1,  
 March5, Tcf7, Wbscr27, Gm6498, Hist1h2bn, Zfp120, Trub1, Mir1936, Ms4a7, Nfatc4, Lrrn3, 40

Trat1, Sox4, Nhsl1, Lincenc1, Tmem243, St6gal1, Dpysl2, Cntln, Il7r, Olfr9, Erbb2ip, Rpl10l,  
 Mir211, Srbd1, Lphn2, Fam3c, Sorcs2, Thrb, Katnal1, Mir199a-1, Fbxo32, Rpap3, Arfip1,  
 Rpl19, Itm2a, Trim56, Ier5l, Btg1, Plekhhb1, Rpl34, Pik3r1, Mir6349, Ikbkb, Cntn5, Sh3kbp1,  
 Btg1, Cd101, 4930523C07Rik, Qsox2, Serhl, Rfc1, Cga, Bmyc, Sla, Rev3l, Fam134b, Ggact,  
 Mir466o, 28-Feb, Akr1d1, Tnfsf11, 2310040G24Rik, Gclc, Pde4b, Dgkz, Hsbp1, Eif3k, Gipc3,  
 Mthfd1l, P2ry1, Ets1, Cxcr4, Pja1, Trem12, Ccr7, C230024C17Rik, Rps6ka5, Klf4, Cx3cr1,  
 Echdc3, Hspa8, Lama4, Mgl1, Ophn1, Thns1l, Disc1, Pdzn3, Sms, Zfp704, Zfp3612, Fam105a, 10  
 Mad2l1, Dazap2, Fbxl14, Vapb, Ifnab, Zgrf1, Rtkn2, Ppp2r3c, Vmn2r96, Bbs9, Ifnlr1,  
 1700064J06Rik, Ppp1r37, Tgfbr2, Slc2a2, Lef1, Ccr7, Foxq1, Gan, D6Ert527e, Snx9, Hes7,  
 Fbxo47, Cox10, Bend3, Sgms1, Slc30a9, Gm3716, Foxo1, Rsbn1l, Tmc1, Fam120a, Gpr18,  
 Efhl1, Ramp3, She, Akap7, Vezf1, Dnajc3, Tnpol, Nudt16l1, Gm19589, Ankrd60, Txk, Lix1,  
 Dnajc6, Serinc5, Lef1, Tars, Gm3336, Bace1, Nedd4l, Trib2, Gm6994, Bcl11a, Mir5127,  
 Klrb1b, Nfix, Tigd2, Map4k2, Uxs1, Bach2, 4930583K01Rik, Klhd9, Eepd1, Als2cl, Pard3,  
 Wdr27, Ikzf1, Btg1, Ly6e, Prm1, Taco1, Itpr2, Limk2, Bend4, Gtf3c3, Kcnh8, Cd96, Fam229b,  
 Adamts14, Lym7, Fhit, Sqrdl, Fpr-rs4, Tmem260, Cd55, Mir214, Mir3093, Amigo2, Dapp1, 20  
 C030018K13Rik, A230028O05Rik, Shf, Lef1, Nrpl, Efr3a, Tmem30b, Mynn, Tgfbr2, Nfia,  
 Ipcef1, Atl2, Thpo, Fam49a, Mir6387, Rtkn2, Gucy1a3, Chrna9, Rassf2, Clip4, Wnt10a, Opalin,  
 Llph, Mir6995, Sorcs2, Slc2a2, Gm20110, Syne1, 2810001G20Rik, 5430434I15Rik, Ppp1r37,  
 Itgb6, Hspa8, Il9r, Glrp1, 5430421F17Rik, Tstd2, Zswim2, Ext1, Slc16a10, Zfp957, Slfn5,  
 Lrch1, Scin, Card11, Ext1, Tet1, Scml4, Diap2, 4933433H22Rik, Zfp629, Tspan13, Prkcq,  
 Zcchc13, Cd74, E330017L17Rik, Tm2d1, Gpr126, Nrn1, Fam124b, Tubb2a, Tdrp, Tnfrsf1a,  
 Foxp1, Fam107b, Epb4.115, Fam78a, Rasal2, Mapk9, Creb3l2, 4930539M17Rik, Kcmf1,  
 Ctage5, Ankrd12, Manba, Tmc1, Lman1l, Nacad, Agr3, 4933433H22Rik, Matk, H2bfm, Kcnh2, 30  
 Pgr15l, Inpp4b, Kcmf1, 4933430N04Rik, Vmn2r92, Stk17b, Foxp1, Cep57l1, Lix1, Kcna10,  
 Vangl2, Treh, Enthd1, Gm6559, Brf2, 4921525O09Rik, Prkcq, Igsf3, Fut8, Limk2,  
 5730508B09Rik, Clasp2, Twsg1, Tmem126b, Hoxa7, Cd28, Sh3bp5, Furin, 1700001P01Rik,  
 Diap2, Tecta, Icosl, F11r, Mir7023, Fes, Map3k5, Spry4, Cd44, Ralgps1, Gm16793, Alox5ap,  
 Mir5098, Arid1b, Ugcg, Ctla4, Snx9, Mir8095, Isl2, Osbp16, Dyrk1a, Cd300a, A930011G23Rik,  
 Fam26e, Ikzf2, Enpp6, Mir181a-1, Lyst, Grhl2, Aldh1a7, Hmgb1-rs17, 2410004B18Rik, Dnm2,  
 Nabp1, Foxp1, Tnfrsf10b, Prkcq, Sgsm3, Agr3, 1700017N19Rik, Tle3, 4933406K04Rik, Insr,  
 Whrn, Ets1, Lef1, Mir5618, Soat1, Ccr7, Cmss1, Ahcy12, Mgat1, Hspa13, Znrf2, Kcnh8, Tdrp, 40

Gm1604b, Vmn2r95, Akap6, Tbc1d22a, Lbp, Mkl1, Rsu1, Sstr2, Slc37a3, Ube2d2a, Itpka, Rnf220, Hnrnp2, Gm2933, Akap2, Pdzk1ip1, Wwp1, Vapb, Dyrk1a, Dynlt1b, Zfp365, Ssh2, R3hdm1, Nek10, Zswim2, Ccdc90b, Znrfl, Ms4a5, 4933406K04Rik, Actr2, Rgmb, Ston2, Gnas, Stk17b, Pim1, Mtr, Klhl2, Cdk15, H2-Ob, Il23r, Slain2, Tssc1, Sbk1, Ube4a, H2-T3, Gtf2ird1, Tyw5, Hbs1l, Efhc1, Rpe, March6, Itga4, Fam13a, Lst1, Ankrd55, Nif3l1, Fam69b, Mir7674, 2810001G20Rik, Gpr19, 4930567H12Rik, Foxp1, Dgkz, Cenpf, Amigo2, Panx1, B4galt3, Pag1, Ubl3, 1110059E24Rik, Hs1bp3, Slc6a19os, Mdm1, Limd2, Slc6a19, Bank1, Alg13, Wisp3, Sult5a1, Fam86, Dennd2d, Cacnb2, Tesc, Mdm1, Adipoq, 1810026B05Rik, Mir325, 1700096J18Rik, D030024E09Rik, G0s2, Mir7219, Slpr1, Cxcr1, Ext1, Chd1, Ly86, Dhx40, 4930564D02Rik, Dctn6, Il7r, E230025N22Rik, Sgk3, Bach2, Ramp1, Syt6, Gsap, Ccdc152, Jakmip1, Atp8a1, Grap2, Dynlt1f, 4921513I03Rik, Gpc6, Kcna10, Ipcef1, Mir7061, Btg1, Stoml1, Zfand3, Aqp4, Zfp281, Ccr2, Nrip3, C230029M16, Tcf4, Hadh, Mthfd1l, Lhfp, Gpr114, Plbd1, 1110034G24Rik, Cd79a, Gse1, Churc1, Map3k7cl, Filip1l, Galnt7, Appl2, March5, Zswim6, Skap1, Tgfbr3, Slc16a2, Palld, Atg10, Cap2, Dfna5, Tlr7, Slc24a1, Hivep2, Dock4, Cd300a, Igf2bp2, A430107P09Rik, Lrrn3, March2, Gm21057, Apbb1ip, Piga, Zbp1, A430107P09Rik, Trappc8, Zdhhc14, Stk17b, Sh3pxd2a, Ppifos, Chd1, Socs1, Kdr, Gramd3, Urad, Sipa1l1, Gm20098, P2ry2, Gas8, Sox5os3, Ccdc117, A130077B15Rik, Basp1, Zfp365, Syde2, Laptm4b, Sik1, 4933433H22Rik, Npff, Arntl, Alb, Zmynd1l, Gm20098, Il9, Hadh, Sstr2, Emp1, Lef1, Galnt10, 5430434I15Rik, Cmah, 4631405J19Rik, Hesx1, Gm16793, Rplp0, Sall3, Xdh, St8sia1, Folr4, Sp3, Rassf3, Aox2, Emp1, Rragc, Proser2, Gm8817, D030028A08Rik, Btg1, Mad2l1, Upb1, 1810006J02Rik, 4932702P03Rik, Rhoh, Gm10790, Dock10, Fam166b, Pcdh1, Zbtb24, Camk1g, 4933407L21Rik, Pde7a, A430093F15Rik, Pmepa1, Ropn1l, Grap2, Rims3, Rps6ka1, Eps15, 4930445N18Rik, 6430710C18Rik, Ppp1r13b, Il21r, Mtmr2, Prex2, Atp6v0d2, Ablim1, Hnrnpd, Syde1, Slc16a1, Mbnl1, Sgms1, H2-DMb1, Ly6a, Tlr1, Gm20098, Galnt5, Edem1, Fam173b, Gpr126, Nbeal1, Prlr, Tmc1, Csrnp1, Atp10a, Dusp4, Lpar6, Pitpnb, Actr2, Ago2, Lphn2, Gm2447, Myo18a, Cd101, Cngb1, 1700027J07Rik, Vmn2r91, Folr4, Satb1, Man2a2, Smim14, 3300005D01Rik, D130058E03, Angptl2, Ercc3, Tmem87a, Syne1, Ptrf, Gm2447, Zscan2, Bend4, Endod1, Tgfb3, Mir6962, Rragd, 4931403G20Rik, Ddr1, Map4k3, Fabp4, Stk17b, Gm5122, Rapgef4, Neurl1b, Pdgfrb, Cirh1a, Fnip1, E030002O03Rik, Fam65b, H2-DMa, Btg1, Zc3h12b, Prkch, Sipa1l1, Tdrp, Adtrp, Fam129c, Runx3, Ilvbl, Tbx19, Filip1l, A430107P09Rik, Ccdc11, Lphn2, Spg1l, Mir6395,

10

20

30

40



Foxp1, Dtnb, Mrpl13, Egl3, Fpr1, Rapgef4, A130077B15Rik, Tlr7, Rbpms, Gm1966,  
 Tmem150b, Rev3l, Mad2l1, Gm1604b, Tasp1, Slc19a3, Trappc10, Ralgs2, Npas1, Ptprs,  
 Slc36a1os, Maf, Wdr12, Polr3k, Gm20750, D14Ertd670e, Fam46c, Fam46c, Ptger1, Lclatl,  
 Ptma, Actn2, Tspan11, Zfp879, Spred2, Satb1, Nabp1, 4930486L24Rik, Ugcg, Txk,  
 A430107P09Rik, Hadh, Abtb2, Rbm33, Fli1, Fyn, Mgat4a, Snd1, Glt8d2, H2bfm,  
 9130401M01Rik, Snd1, Mir3079, Pedh7, Cnga1, Tldc1, Ugdh, Aven, Mir8104, Rgl1, Sox6,  
 Map3k14, Akirin2, Mir684-2, Rfx2, Fyb, Ccdc71l, Ece1, Gm8884, 4921507P07Rik, Mir6933,  
 Slc6a7, Cox7b2, Rfx4, Gm5617, Sh3kbp1, Pds5a, 9030617O03Rik, Gpr126, Ctnnb1, Prpf40a,  
 Gpr22, Cldn10, Cdk19, Sgk3, Rgs3, Mir6995, Cdon, Stk17b, Samhd1, Gm16793, Lag3, Olfm2,  
 Cyb5a, Zfp438, Akap2, Dpfl1, 3110052M02Rik, Lrp6, Haa0, Camk2a, Tspan9, 5430434I15Rik,  
 Stk24, Tlr12, A930005H10Rik, Slc4a4, U2af1, Fbxl21, Opalin, Rybp, Igsf3, Aim1, Wasf2,  
 Rgs3, Frs2, Smok4a, Pak4, Zscan22, A430107P09Rik, Slc35b3, Serpinb5, Med30, Cdc16,  
 Agfg1, Tmem261, Plxna1, Myo5c, Gpr183, Suclg1, Cdk19, 4930556N09Rik, Lpp, Tmem260,  
 Ubqln2, Mir378b, Btla, Gm19589, Ano6, Clint1, Ube4b, Olfr1507, Rab33a, 4930523C07Rik,  
 St6gal1, 1600014K23Rik, Nnmt, Ift80, Htr3b, Rpl34, Ipcef1, Psma6, Dnmt3a, Hpgds, Stxbp3a,  
 Mir6907, 1700056E22Rik, Smad7, Mir7078, Mir181b-2, Il27ra, Stat1, C030018K13Rik, Foxq1,  
 Hpcal1, Msra, Zc3hav1, Tdrd6, Tnfrsf4, 4921517D22Rik, Rubie, Plekhg6, Brd4, Sort1, U90926,  
 4930519F09Rik, Il4ra, Smyd2, Prkch, March9, Ghssr, Rps6ka2, Rpp21, Vps13c,  
 1600002D24Rik, Fam136a, 4921511I17Rik, Spefl, Maml3, St8sia1, Ssbp2, Stk4, Tnfrsf19,  
 Snord104, Olfr1507, Dysf, Cntn5, Cd2, Raver2, Gm10790, Pja1, Tmprss9, Klf5, Ubash3b, Tle3,  
 Scml4, Snx4, Tert, Sptbn1, Mir326, Aff1, Gm8298, Ephb2, Tec, F3, Exoc6, Sema4f, Dennd1a,  
 Gmcl1, Gm10532, St3gal1, Chd7, Gm6268, Tox, Pja2, Klhl3, Dnajc10, Foxp1, Trp53inp1,  
 Gtf3c3, Scd2, At12, Dach2, Lynx1, Cand1, Cxcr4, Gm20098, Fscn3, Il9r, Dph5, Sh3bp5,  
 St6gal1, Fli1, Mir5127, Ubacl1, Gm16793, Nsmaf, Sp6, Rnf145, Ccr7, Orail, Serbp1,  
 St6galnac5, Tox, Cacna1b, A430035B10Rik, Alpl, H2-DMb2, Etnk1, Olfr1507, Mtr, Rgmb,  
 Pmp22, Dctn6, Fli1, Mir326, Slc17a7, Sepp1, Slc6a19, Cngb1, Mir7681, Ccr9, Klhl4, Atp6v1g3,  
 Clec16a, Speer2, Gsn, Umps, Unc5cl, Aox2, Dcaf8, Igf2bp3, Car2, Rnf43, Kdm7a, Tgfb3, Eldr,  
 BC094916, Unc80, Zmynd11, Nabp1, Adamts14, Gm20139, Fgfr1, Tmem141, C130026L21Rik,  
 D630039A03Rik, Mturn, Herc3, Gm5468, Mir6398, Fam86, Nsg2, Cblb, Erbb4, Mir7-2,  
 Smurf1, Clec16a, Lhx2, Tomm20, Ifngr2, Acacb, Gm10791, Bach1, Epb4.1l2, Tmem154, Tssc1,  
 Vdac1, Itgae, Raph1, Klf3, Pnrc1, Sell, Tdrp, Ptk2, A630072M18Rik, Slc41a3, Rab11b,

10

20

30

40

Tnfrsf10b, Lrp12, Ptger3, Aggf1, 1700029F12Rik, Dpf1, Gm14295, Ubqln2, Coq2, Txndc8, P2ry1, 4933430H16Rik, Tctex1d1, Sfmbt2, Alg14, Tha1, Ets1, Cd101, Neu3, Mob3b, Kcna2, Irs2, Mbnl1, Fntb, Nipbl, Slc16a5, Ccdc174, Ncs1, BC037032, Fryl, Lipa, Hs1bp3, Cd101, Chd1, Atad1, Ppp1r3fos, Pde4b, Lamtor3, Klf2, Ttc27, Dntt, 5830454E08Rik, Panx1, Cyp2r1, Rhou, Mir701, Ccr7, Arhgap26, Ankrd36, Retnlb, Themis, Med13l, Slc6a19os, Znrf2, Mettl8, Mir3108, D030025E07Rik, Mir145b, Iqsec1, Cd8b1, Clic1, 1810026B05Rik, Ptpers, Med7, Mthfd1l, Dnalil, Bach1, Mgmt, Ppm1b, 4933430H16Rik, Cd40lg, Txk, Cdc14a, Il9r, Slc7a15, Prkch, Srpk2, Tmbim7, Rcor1, Vtila, B3gnt2, Tmem261, Gria3, Tusc3, Rgs3, Satb1, Sept6, Setbp1, Cep68, Ric8b, Il6ra, Znrf2, Lypd6b, Tmem29, Myh9, 4921511I17Rik, Dlx1, Lhx2, および/または Chst15

10

である。

【 0 1 6 1 】

特定の実施形態において、転写標的は、  
Irf8, Ctps, Chst15, Sipal1l,

2610005L07Rik, Irf8, Etv5, Ctps, Grk5, Cd200r2, Cenpu, Atp2b2, Srfbp1, Fndc9, Tlr6, 3300005D01Rik, Vav3, Dusp5, Sipal1l, Chst15, 2610005L07Rik, Cxxc5, Mrc2, Plod3, Bmpr2, Cd55, Ear2, Tmtc4, St6galnac3, Cenpa, Filip1, 6330407A03Rik, Gm10389, D8Ert82e, Gm156, Mcf2l, Enpp6, 2610005L07Rik, Cdyl2, 3300005D01Rik, Gm10389, Irf8, Mir3081, Grk5, Enpp6, Srfbp1, 3300005D01Rik, Vav3, Chst15, Sipal1l, Filip1, 2610005L07Rik, Bmpr2, 4930415F15Rik, St6galnac3, Ralgapa2, Tmtc4, Abhd6, Gm10389, Zfp361l, Ctps, Atp2b2, Fndc9, Tlr6, 3300005D01Rik, Dusp5, Cxxc5, Irf8, Plod3, Bmpr2, Cd55, Ear2, St6galnac3, Cenpa, Grk5, Filip1, 6330407A03Rik, Srfbp1, Filip1, Snail, Il7r, Il1r2, Ly6i, Gm5, Snail, Snail, Klrg1, Tff1, Zfp361l, Pmepa1, Urb2, Snail, Klrg1, Fchsd2, Il7r, Zfp361l, および/または Klrg1

20

30

である。

【 0 1 6 2 】

操作されたT細胞

特定の実施形態では、本発明は、癌または感染性疾患などの疾患を有する患者において免疫応答の増加に寄与する変化したエピゲノムを有するように操作された細胞（たとえば、T細胞）を供する。特定の実施形態では、本開示の操作されたT細胞は、高優先度エピジェネティック経路の変化を含む。特定の実施形態では、T細胞は、疲弊したT細胞（TEX）である。特定の実施形態では、高優先度エピジェネティック経路が標的化される。特定の実施形態では、高優先度エピジェネティック経路を標的とすることにより、T細胞の疲弊を防止または逆転させる。エピジェネティック経路の標的化（ターゲティング）により、Tox、SETタンパク質、RuvBl1タンパク質、RuvBl2タンパク質、DPY30タンパク質、Tox2、Suv39h2、Csprs、Sfmbt1、Hmgn3、Chd9、Rnf2、Ikzf3、Kmt2e、Satb1、Tet1、Tet2、Tet3、Kdm5b、Sfmbt2、Actr6、およびPrmt7のうちの少なくとも1つの発現における1つまたは複数の変化を生じさせることができる。特定の実施形態では、エピジェネティック経路は、薬物またはCRI SP R / C a s 9ターゲティングを介するゲノム工学を用いてターゲティングされる。

40

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態では、薬物は、5 - アザシチジン（Aza）、ゼブラリン、DNMT1阻

50

害剤、たとえば、RG108、BETファミリータンパク質阻害剤、たとえば、I-BET726 (BET726の阻害剤)、ヒストンアセチラーゼ (HAT) 阻害剤、たとえば、クルクミン、ガルシノール、アナカルジアック酸である。特定の実施形態では、薬物は、PCAFおよびp300を阻害するイソチオゾロンである(Heerboth et al. Use of Epigenetic Drugs in Disease: An Overview. Genetics & Epigenetics 2014:6 9-19)。さらなる実施形態において、薬物は、Lys - CoA、C464、ヒストンメチル化阻害剤、たとえば、3-デアゼパノクリンA (DZNep)、HDAC阻害剤、たとえば、アミノスベロイルヒドロキサム酸、たとえば、スベラニロヒドロキサム酸 (SAHA; 商品名Vorinostat)、またはACY-1215 (HDAC6の阻害剤) である。

【0164】

10

#### エピゲノムのシグネチャ

疲弊したT細胞は、ナイーブ、エフェクター、および/またはメモリーT細胞と比較して、独特のエピゲノムを有する。この独特のエピゲノムは、本明細書では「エピゲノムのシグネチャ」と呼ぶ。エピゲノムのシグネチャは、TEXにおいてユニークに表現される遺伝子のシグネチャを含む。

【0165】

活性化状態の変化および疾患状態との関係を同定して列挙できるだけでなく、調査することもできるアプローチは、免疫療法の患者を監視する上で考慮すべき価値があり、免疫療法アプローチの選択を導き、免疫学的治療反応の追跡を助けるのに用いることができる。

【0166】

20

TEXにおいてユニークに発現される遺伝子のシグネチャは本明細書において同定される。特定の実施形態において、TEXにおいてユニークに発現される遺伝子のシグネチャは、以下：

A330093E20Rik, Rnf19a, 2010010A06Rik, Cdh23, Abtb2, Dync2li1, Lrrc1, Scn1b, Man1a, Gimap3, Lef1, Col26a1, Gpr180, Fam126a, Wdyh1, Mir6395, Gpr34, Fcgr1, Rpia, A430107P09Rik, Hbs1l, Slc35b3, Tmem248, Cox7a2l, BB019430, Pde5a, Sept7, Lrrc3b, Cd101, Znf3, Znf1, Gm6260, Prpf40a, Ets1, Scn3a, Kremen1, Fam210a, Trpm1, Pip4k2a, Trnp1, Sell, Nfia, Lipa, Zc3hc1, Msn1, Yeats4, Abcd2, Tbc1d1, Kcnh8, Zfp407, Capg, Gm7538, Rgcc, Sh3bp5, S1pr1, Zfp957, Mcur1, D16Ert472e, Trat1, Fam107b, Mbtpr1, Egr3, Palm3, 9030624G23Rik, Ppp6r1, Ckap4, Rngt, Crt3, Peak1, Lhx2, Btg1, Serbp1, Cd2, Acox1, Hormad2, Gm10684, Smo, A630075F10Rik, Ndst1, E030018B13Rik, Skp1a, Kcnh8, Nck2, Frmd7, Cldn10, Peli1, 2010300C02Rik, Ins15, Supt20, Slc4a4, Rph3a1, Dip2c, Pm20d2, Nsg2, Rbm26, Tpk1, Stambpl1, AF357399, Car2, Mir145b, Zfp592, Galnt4, Gm5083, Thns1l, Dhx40, Gm20098, Ly6i, Sugt1, Ywhaz, Rad23b, Bcor, Gm12159, Vegfa, Cacna1b, Arhgef11,

30

40

50

2210408F21Rik, Mettl8, Wdr73, Usp12, Art4, Clvs1, Mir6388, Diap2, Gm10532, Msi2,  
 4930546C10Rik, Mbnl1, Tm6sf1, Ppp2r5a, Mageb16-ps1, Neurl1b, Sspn, Suv420h1,  
 2410088K16Rik, Rgl2, Timm8a2, Aebp2, Maml2, Ldhal6b, Peak1, Parp2, Apbb2, Tctex1d1,  
 Dtnb, Tspan3, 4930578N18Rik, Pced1b, Commd9, Lrrc3b, Rras2, Gm10638, 1600002D24Rik,  
 Arsb, Ube2e2, 1700009P17Rik, P4ha2, Susd1, Cdkal1, Efcc1, Malat1, 4931403G20Rik, Tox,  
 Arpc3, Atg10, Gpbp1, Gm5148, AI317395, Abhd2, Celsr1, Tsen2, Pfkfb3, Cyc1, Mir378c,  
 Slamf6, Btg1, Phf2, Cxcr4, Gm10789, At12, 6030407O03Rik, Ggnbp1, Angpt1, 10  
 9530077C05Rik, Basp1, Rapgef6, H2-Ea-ps, Fam214a, Ppfia4, Lta4h, Ets2, Slc29a1, Xpo4,  
 Gramd3, Itfg3, Fli1, Frmd6, Rbp1, Olfm13, Peli1, Srpkl, Hmgcs1, Irf2bp2, Cxxc5, Ccdc171,  
 Cntnap2, Fance, Cblb, Cubn, Sfmmt2, Srsf3, Pepd, Dgkd, Osbpl6, Trib2, Zfand3, Dchs1,  
 5430421F17Rik, Fpr3, Dapl1, Trat1, 0610040J01Rik, Gm14005, BC051019, Tank, Tnfsf11,  
 Rara, Pik3c2a, Elmo1, Nck2, Bcl2l11, Fam78a, Gm10638, Prkcq, Gpr126, Bach2, Ttc30b, Nlk,  
 Ube2e2, Usp3, 4932441J04Rik, Larpa4b, Serbp1, Dbn1, Vav3, Derl1, H2-T23, C130021I20Rik,  
 Fbxl14, Ets1, Fgf8, Abl2, Acvr1b, Upk1b, Efcab10, Uchl3, Cd302, Cdc40, Nsg2, Tmem222,  
 P2ry10, Klrb1b, Mc1r, Car8, BC048403, Taf8, Atp1b1, Mir30c-2, Luc7l2, Erbb4, Arhgdib, 20  
 Ube2h, Itpr2, Vav3, Ptgfrn, D630010B17Rik, Eif2s3x, Vav3, Nfe2l3, Ccdc171, Figl1,  
 4930519F09Rik, 1700123O12Rik, Acsf2, Ndufb9, Atp7a, Upp2, Ptpla, Man1a, Rgs3, Zbtb2,  
 Trib2, Npr1, Fez2, Tle4, Fuca1, Cmip, Bcap29, Syne1, Dmbt1, Ell, Blnk, Sepw1, Gltsr1, Erdr1,  
 Med13l, Moxd1, Btg1, Akap6, 1810053B23Rik, Rsu1, Gprasp2, Art4, Gpd2, Tmlhe,  
 A430107P09Rik, Kcnj9, Atp8a1, Adam6b, 2010109I03Rik, Spred2, Raver2, Ap1m2, Dclrela,  
 Rbp7, Gcc1, Traf4, Satb1, Gm5538, Il12a, Fam60a, Thrb, Elk3, Vps45, Tle4, Akap13, Gprin3,  
 Sox21, Emp1, Wfdc2, Slc45a1, Lnpep, Rapgef6, Txn2, Frmd4b, Myoz3, Zfp870, Bcl6, Mvb12b,  
 Ntrk3, Spaca1, Mir701, Cdca7, Gm5083, S1pr1, Spry4, Cck, Il6st, Hebp2, Slc43a2, Tdrd5, 30  
 Gm5833, Mir7-2, Mir1931, Pdgfb, 1700052N19Rik, Nfkbiz, Gm20753, Hapln1, Rras2, Diap2,  
 Manba, Cers6, Rasgrp1, Lnpep, Apln, Ephb2, Arpp21, Mical3, Chic2, E130114P18Rik, Ipcefl,  
 Dyrk2, Bach2, Mir122a, B230206H07Rik, Ceacam9, A730006G06Rik, 4930542C21Rik,  
 A430107P09Rik, Trat1, Ccr2, H2-Ob, Adm, Yeats4, Ccne1, Gpc5, Spsb1, Jrkl, Orc4, Camkmt,  
 Nfia, Celf2, Gadd45a, Gtf2a1, Nrde2, Nipa2, Rmi2, Lcor, Btg1, Atg10, D6Ertd527e, Ccm2,  
 Dpysl2, Dirc2, Cpm, Arhgap15, A730043L09Rik, Raph1, Cst10, Slc7a13, Ramp1, Atp1b1,  
 Zfp120, Slc39a13, Zfp706, Agr2, Tagap, Mir3110, Ubash3b, Dnmt3aos, H2-B1, Agbl1, Smc6,  
 1700060C20Rik, Trib2, A930005H10Rik, Btg1, Scml4, Mir196b, Efna5, Tmem14a, Kcnj15, 40

Snrpd3, Nnmt, Ryr1, Ptk2, P2rx4, 5830428M24Rik, Commd3, Cd28, Hspb11, BC021785, Tcf7,  
 Cstb, Art4, Tet3, Map3k13, Camkv, Ralbp1, 9330175M20Rik, Tgtp1, Selt, Irgc1, Tcf7, Tet1,  
 Bnip3l, Nrbf2, Nim1k, Rfx8, Tlr6, Grik1, Tox, 1700061G19Rik, Dhrrs3, 4930519G04Rik, Mid1,  
 Aplar, Basp1, Aqp4, 4930415F15Rik, Aifl, Rnf125, Fam134b, Atp13a3, Dmbt1, Mbnl1,  
 Nfam1, Lmo4, Znrf1, Ambp, 4930523C07Rik, Bfsp2, Zfp592, Gm2447, Gm16157, Gjd3,  
 Tgtp1, Ston2, Lypd6b, Rnf7, Zbtb2, BC051537, 4930417O13Rik, Arntl, Ttc9b, Foxp1, Mir7219,  
 Mrgprb5, Tnik, Dhrrsx, Foxp1, Tubb2a, Cyb5r2, Itga4, Snx9, Fam65b, C78339, Mir7212,  
 Ldlrap1, H2-Oa, Snx12, Tdrp, Mnd1-ps, Foxp1, Gucy2c, Creb1, Scn4b, Irf4, Rftn2, Gpr125,  
 Dpf1, Fam134b, Akap13, Tmem108, Suclg1, Mn1, Sema4b, Gm6682, Slc46a2, Dennd3, Bach2,  
 Sytl2, Grhl3, Smad3, 1600014C10Rik, 4930455C13Rik, 3200001D21Rik, Nup153, Grk6,  
 Zfhx3, Fhit, Hmg20b, 4930564D02Rik, Bach2, Slc39a3, Urad, Smc1a, Maml1, Zadh2,  
 8030462N17Rik, Fsbp, Tmem243, Srp14, Lix1, Tmc1, Tspan11, Tns1, Serpinb5,  
 1810026B05Rik, Smad7, Mir3108, Phxr4, Tmem131, Olfr1507, Kidins220, Mir378c, Afap1,  
 Rere, Sin3b, Efemp2, Neto2, Mir7669, Tgtp1, Gramd3, Map7d2, Chst2, Sp110, Cedc162, Igflr,  
 Mir3110, Dcdc2b, Dse, Dlgap2, Armc9, E230029C05Rik, Gm11944, Tnik, Kat6b, Nkiras1,  
 Tbccl, B4galt1, Cd2ap, Tnks, Icos, Tanc1, Sik1, Tor1aip2, 4930453N24Rik, Bnip1, Gm6313,  
 4930415F15Rik, Inpp5a, Atoh7, 2210417A02Rik, Pdss2, Lamtor3, Ptbp2, Ostml, Nrarp, Fryl,  
 Mir1907, Gm10638, Sumo1, Zfp60, 1600014C10Rik, Haao, Syde2, Ep300, Ndrp3, Tex2, Cdx2,  
 Eefsec, Tmem131, Mir6959, Fyn, Prkcc, Mical3, Snhg7, Ambra1, Rag2, Vdac1, Ptp1a, Tram1,  
 Aak1, Pebp4, Sgpp1, 2410007B07Rik, Itpr2, Tulp2, Mir6395, Elovl6, Ppp1r3b, Zc3h4, Sptbn4,  
 Rap1b, Vgll4, Kcna2, Cnot6, Tbc1d1, Pde4d, Rapgef4, Fbxo47, Proca1, Airn, 2310001H17Rik,  
 Tmem131, Sh2d3c, Gtpbp8, 1700030C10Rik, Polr3b, Fam69a, Bcan, 4930465M20Rik, Sbpl,  
 Emgl, Aaed1, LOC102633315, 5930430L01Rik, Adsl, Foxp1, Gm20337, Trdmt1, Gm9920,  
 Foxo1, Olfm13, Fyb, Pgpep1l, Nsg2, Tex26, Fancc, Cngb1, Rapgef2, 2010010A06Rik,  
 2410007B07Rik, Lbh, Pnrc1, Lad1, Mycn, Abhd15, Cd1d2, 4930428G15Rik, Hnrnp1l, Dnaja2,  
 Ccr7, Mmp15, Neto2, Bach2os, Efr3a, Rnf41, Mir7656, Znrf3, Rtkn2, Sesn1, Zp3r, Glrp1,  
 Kdm7a, 3200001D21Rik, Pdss1, 5730403I07Rik, Mmp15, Thrb, Zbtb16, Vkorc1,  
 E330009J07Rik, Dntt, 4933406J10Rik, Sim2, Lgals9, Gm12216, Grb10, Ednra, Fam3c, Birc6,  
 Bace1, Sfrp2, 2010107G12Rik, Zfp184, Ctso, Zfp462, Abcb1a, Gm6639, Mir1258, Dyrk1b,  
 Ralb, Thrb, S100a6, Gm590, Dnajc1, Zfand3, Blm, Ikzf2, Lrrc32, Nsg2, Foxp1, Tnpol, Zfat,  
 Specc1, Snora75, Vps45, Acp6, Syde1, Extl3, Fbxl14, Cdh26, Celf2, Cd2, Tshz2, Cntln,

10

20

30

40

Fam65c, Dad1, Akap6, Gm15880, E330011O21Rik, Kdf1, Gstt1, 2700046G09Rik, Sort1,  
 Nyap2, 1700063O14Rik, Cog6, Extl1, Vmn2r96, Il12b, Lclat1, A430107P09Rik, Zkscan16,  
 Chl1, Nck2, Cdy1, St6gal1, Mir21c, 2810428I15Rik, Cnr2, Rab44, 1700064J06Rik, Zfp191,  
 Peli1, Als2cl, Gnas, 2300005B03Rik, BC033916, Cd226, 1700049E22Rik, Nipal1, Gimap6,  
 Gm5086, 8430436N08Rik, Ift80, Zfp697, Svs1, 4930459C07Rik, Epcam, Zfp706, Pde11a,  
 Slc43a1, Slc9a9, Tshz2, Fbxw11, Mir7046, Zpbp, 1700123O12Rik, Slc16a1, Gm7457, Tcf4,  
 Fbxl12, Il9r, Galnt6, Gm5868, Panx1, Hs3st5, Jarid2, Phxr4, Dock2, Nrip1, Laspl, 10  
 1700066B19Rik, Marcks, Plekha7, Wdr41, Pdss2, Gpr83, Rapgef4, Gm15910, Colq, Olfr1507,  
 Vgl14, Fgfr1op, Fanc1, Capn1, Lonp2, Rnf38, Gpaa1, 1700016G22Rik, Vmn2r98, Gm7325,  
 Gm826, Rpl31, Klrc1, Ikzf1, Crlf3, Cd44, Gypc, AU019990, Fbxl13, Tsc22d3, Tgm2, Ptpn14,  
 Fance, Arhgap26, Tgfbr2, Klf2, Sept7, Ptprc, Btn2a2, 4921511I17Rik, Ppp2r5a, C78339,  
 Arhgap39, Ism1, Mpsz12, 2810459M11Rik, Dyrk2, Tspan13, Fbxl14, Plat, Celf5, Susd3,  
 Rps6ka2, Gtf2ird1, Naif1, Rsph3a, Tsse1, Ext1, Snora7a, Bcl2l11, Pip4k2a, Npl, Tmem236,  
 Cox7a2l, A530013C23Rik, Rgl1, Pgk1, Ift80, Emid1, Inpp4b, Cldn10, Glis, Tnni1, Folr4,  
 Gm5766, Olfr1507, Hpcal1, Cyth4, St8sia6, 5430434I15Rik, Ropn11, Serinc1, Mad2l1, 20  
 4921525O09Rik, A430107P09Rik, Gm11127, Tra2a, Urb2, Pgpep11, Cacna1d, 5730403I07Rik,  
 Fam49a, 1700025F24Rik, Stat1, Calm1, Kcna7, Eif1, Mir669m-2, Kdr, 1700123O12Rik,  
 Mir8099-2, Hspa8, 2010010A06Rik, Zfp53, 4930524O05Rik, Abl1, Uvrag, Slc16a1, Dnah7b,  
 Golph3, Ipcef1, Usp3, Jun, Snord89, Tcf7, Rbpms, Folr4, Papss2, Spred2, Stpg1, Mgat5, Lpin1,  
 D8Ert82e, Dhx40, Slit3, 4933405E24Rik, Nsun6, A430107P09Rik, Apol7e, Raly, Celf2,  
 Ndufs7, Mir6921, Kbtbd11, Gc, Haa0, Gm9054, Slc44a3, Tnfrsf19, Lef1, Ankrd11, Plxdc1,  
 A430107P09Rik, Zcchc2, Zmat4, Jun, Adamts14, Slamf6, Adamts17, A430107P09Rik, Alox5ap,  
 Mir6368, Ncor2, Ets1, Pmpcb, Mvk, 4922502D21Rik, 1700025G04Rik, Rgmb, Gpnmb, Stk17b, 30  
 Ceacam9, Ttc1, E130006D01Rik, Camkmt, Ankrd63, Agtr1b, Khdrbs1, Zfp706, Cux1,  
 4922502D21Rik, Btbd1, Timm8a2, Itga4, Reep2, Uvrag, Cyfip2, Elovl6, Tfeb, Spag16, Tbc1,  
 Lmo2, Rasgrp1, Fam86, Ktn1, Fbxo32, Gata3, Ly86, Ptgs2os2, Fam111a, Lrrc16a,  
 B430306N03Rik, Tff3, Kcnn4, Mtif3, Ldlrap1, Tmem260, Pla2r1, Basp1, Ncoa3, Ngly1,  
 Ccdc162, Nhsl2, Cdc123, Hnrnpu, Arhgap18, Zf12, Gm6498, Bex6, B630005N14Rik, Dynlt1b,  
 Lypd6b, Clec2e, Rbm17, Pstpip1, Lrp12, Akap2, Camk2d, Igf1r, Atpl1a1, Gsn, Rragd, Actn1,  
 Odf3b, Nudt4, Vmn2r99, Parp11, Adipoq, Fam221a, Il6ra, Kif23, Fabp5, Srpk2, Ikzf1, Fbxw7,  
 Slamf9, St6gal1, Vav1, Serbp1, Reep1, Agr3, Plcl2, Kcnj15, Aeabp2, Gm20139, Mtx2, Sel1l, 40

Mbnl2, A430078G23Rik, Krr1, Lclat1, Zfp438, 4930487H11Rik, B4galt1, Ifngr2, Olfr221,  
 Asb4, Gm6793, Ap1m1, Pdlim5, Gltscr1, 1110032F04Rik, Ankrd13a, Abcd2, Iqsec1, Inpp5a,  
 Pdzn3, Akirin2, Pip4k2a, Dyrk2, Jun, 4930465M20Rik, Osbp19, Ttc30a1, Ctnnbl1, Tmem243,  
 Olig3, Ubtd2, 4930540M03Rik, Dnajc5b, Dennd1a, Gadd45a, Rpl8, Dapl1, Cd2ap,  
 6430710C18Rik, Slc16a5, Rcbtb2, Hmgxb3, A630075F10Rik, Ankrd2, St8sia1, Ptk2b, Paqr8,  
 Tox, Wdr37, Stat4, Rplp1, Ccnj, Hspbp1, Mthfd11, Zcchc9, Gm13293, Camk4, Htt, Usp10,  
 Plekha6, Gm5617, Cnksr3, Mir7218, Lcp2, Cd28, Lbp, Ncoa3, Skil, Hey1, Mir6368, Akap6,  
 Spin1, Ccdc174, Stambpl1, Ggta1, Pifo, Stim2, Rras2, Tomm20l, Gm5538, Skap2, H2-Ob,  
 Zfp3612, Clec2d, Erdr1, Dapl1, Vasp, Cytip, B4galnt3, Hamp, Mex3b, Tcf7l2, Vps13d, Alox5ap,  
 Mtss1, Gm7457, Fam46a, Taf3, 2810408I11Rik, Ms4a7, Mad2l1, Selt, Snrpf, Hcn2, Frmd4b,  
 Hivep1, Tspan13, Nfia, Asap1, Nt5e, Misp, Maml2, Sh3pxd2a, Ccdc162, Setd7, Etoh1l, Acvrl1,  
 Fntb, Shank3, Rhoh, Prok2, Marcks, A830010M20Rik, Ywhaz, Mtss1, Gm8369, Fam188b,  
 Atp2a2, 4933405E24Rik, 4932443I19Rik, Notch2, Zc3h12b, Numb, Neb, Ramp1, Zfp831,  
 Impdh2, Grk1, 4930459C07Rik, Mir7035, Setd3, Cdc42se2, Spo11, Fam166b, Mir6419,  
 Atp10d, C2cd5, 4933412E24Rik, Boll, Calr4, Il22ra2, Slc22a16, Syde2, Fyn, Slc27a6, Stx3,  
 Gm6313, Rbm18, Gm13293, Tbc1d8, Fabp5, 4930546C10Rik, Slc16a1, Cnr2, Kcnip2, Trim69,  
 Agbl1, Plvap, Ms4a6c, Usp38, Atl2, Sh3kbp1, Ppfibp2, Pim1, Pmis2, Sh3pxd2a, Ms4a4c, Klf3,  
 Cblb, Mir701, Dmwd, Mtss1, Cdkl3, Cabp2, Chdh, Pde4b, Ston2, Cmah, Fbxl14, Syk, Trio,  
 Btg1, Ski, Cnot2, Stk38, Tm9sf3, 4930482G09Rik, Parp11, Jarid2, Maml3, 6430710C18Rik,  
 Commd9, Fhit, Scamp1, Tcf7, Ncf1, Ric8b, Gm3716, Scml2, Nr2f2, Ssr1, Il6st, Ankrd50,  
 Pnmal2, Foxp1, Raver2, Ccdc64, 8430436N08Rik, Klf13, Itga5, Commd3, Mro, Ms4a7, Rock2,  
 Enc1, Rab3gap1, Nav2, Tlr1, Gm7457, Elfn1, Rpl34, Agfg1, 1700020N01Rik, Irf4, Gm8369,  
 Olfr1507, Grik4, Akap6, Mir6387, Thrb, Gm20110, Mir7670, Bag4, Gm15441, LOC101055769,  
 Pak1, Mbd2, Ralgps2, Lipg, Gpnmb, Ubash3b, Kntc1, Aqp9, Znrf2, Cmah, Peli1, Chd7,  
 Tmsb4x, Copb1, Gimap1, Bcas1os2, Ppapdc1b, Cdc14a, Ier5, Susd3, Birc2, Sun2, Itga5, Rlbp1,  
 St8sia1, Hectd1, Chn2, Bcas1os2, Slc39a11, Cdc7, Me3, Stk17b, Ccr4, Peli1, Cd226,  
 2510009E07Rik, Sh2d1a, Zfp2, Mei4, Chst2, Nipa11, Tbc1, Itgb6, Tmed10, Gm4489, Tmcc1,  
 A430107P09Rik, Abtb2, Tgfbr3, Zfp704, Reep5, Apccdd1, Pik3r1, Msl2, Gm20098, Eif4e3,  
 5430402O13Rik, Tsscl1, Lphn2, Kcnh8, 4921525O09Rik, Fam46c, Pum2, Itsn2, Slc11a2,  
 Usp6nl, Gimap6, A430107P09Rik, Nipbl, Nrnx3, 1700042O10Rik, Capn3, 4930526I15Rik,  
 Plat, Gm15850, Dock10, Shisa2, Wbscr16, Egfl7, Zfp957, Gm20110, Slc4a8, Ago2, Pnp2,

10

20

30

40

Tgfbr3, Hmga2, Pdlim7, Dip2c, Atp1b1, Pxx, Snora26, Gm6498, Sema3d, 3300002I08Rik,  
 9330175E14Rik, BB123696, Fibcd1, Slc6a19, S100a6, Commd9, Lpar4, Cntn5, Nr1i2, Panx1,  
 Dock2, Pto1, 5330411J11Rik, Sec24d, Ms4a4b, Eif3g, Rsbn11, Plxnc1, Jarid2,  
 1810041L15Rik, Diap2, A630075F10Rik, Klf13, Tlk1, Lef1, Slc4a4, 2610020H08Rik, Tbce,  
 9430014N10Rik, Slc16a10, 2310042E22Rik, Lrrc3b, St6gal1, Tnfrsf1a, U90926, Fam134b,  
 Grxcr2, Dok5, Aldh8a1, Cybrd1, Smarcb1, Jmy, Zfp608, Cdkn2aipn1, Aire, Prps2, Gm839,  
 4933412E24Rik, St6gal1, Ube2d2b, Mab211l, Slc23a2, Keap1, Brdt, Piwil2, A930005H10Rik, 10  
 Fyb, Ncald, Lgals9, Zfp704, Dguok, Gm15706, Nr3c1, Med13, Rictor, Paxbp1, Mir1903, Sv2a,  
 Slx1b, Tbc1d24, Wnt5b, Ccr7, Ptk2, Mir21c, Aox4, Slc35b4, Mgat5, Zfp281, Mycn,  
 1700016G22Rik, Odc1, Prkcb, Atel1, Ncbp1, 3300002I08Rik, Ly6d, Spag16, Clk1, Atg10,  
 1700030L20Rik, Nsg2, Agps, Golt1a, Cntn5, Cadm4, Malsu1, Frmd4b, Gm6607, Cdh23,  
 Gramd4, Slc44a2, Limd2, Lphn2, 1700010K23Rik, Lrrc66, Akap7, Pea15b, D030024E09Rik,  
 Zscan10, Lsm2, Kcnj13, Cdhr3, Fbxl17, Lhx2, Olfm2, Cyp2r1, Wisp3, BB123696, Nlrc4,  
 2010010A06Rik, Elovl6, Eea1, Mir1907, Glis, B4galnt3, Epb4.1, Tshz1, Gpr126, Rgmb, Ncs1,  
 Tet1, Hoxa1, 4930515G16Rik, Usp33, Stk10, Klhl6, Ccdc109b, Manba, Gm5111, Chst15, 20  
 Runx1, Rgs3, Gm4759, Ldlrad4, 4933400F21Rik, 4933406C10Rik, Diap2, Mir6403, Plin2,  
 Zmiz1, Maml3, Fam86, Hbs1l, Inpp4b, Gm14405, Mgat5, Cntn5, Ramp3, Ifnk, Pgm1, Mfsd6,  
 Armcx1, Mir5127, Gimap6, Mir6387, Slc38a2, Gsdmcl-ps, Cd24a, Kmt2e, Csrp1,  
 9530052E02Rik, Stk17b, Fyb, Lhfpl5, Atp8a2, Amn1, Sertad2, Epb4.1l2, Stk24, Cdk17, Camk4,  
 Rpa1, Zmynd11, Efcab11, Mir491, Zc3hc1, Vps45, Rgs3, Ube2m, Tspan5, Insr, Snapc1, Btg1,  
 Cox10, Znrfl, Camk4, Ddr1, Gm11981, Sesn1, Commd8, Nrip1, Polr3k, Eya3, Ppp1r1b, Pcdh7,  
 A430107P09Rik, Efccl1, Mtss1, Hpn, Armcx1, Gm20139, Alg14, Sec11a, Cyb5d1, Trpm1,  
 Fam65b, 5730508B09Rik, Frmd4b, Gm10584, Gm5069, Pmepa1, Sell, Mir6413, Klf12, Rhoq, 30  
 Plcl2, Prrc1, Emp1, D030024E09Rik, Rnf145, Bach2, Prkcq, Hic1, Msmo1, Map3k7cl,  
 AI854517, 4922502D21Rik, Vti1a, Zcchc9, Spats2, Mir7681, Wdr89, Bel6, Cytip, Gm13293,  
 Creb3l4, Peli1, Pak1, Efcab11, Usp7, 4931403G20Rik, 1700030A11Rik, Mvb12b, Ampd3,  
 Cubn, Baiap3, Med30, Actbl2, Kat6b, Peli1, Tmevpg1, Nsf, Hpcal1, Ube4b, Fam110b,  
 C330011F03Rik, Inadl, Sesn3, Tmem30c, Itgb6, Dlg1, Srp14, 3300005D01Rik, Ggact, Mir21c,  
 Cyp2s1, Mir7061, Bach1, Insr, 2410114N07Rik, H2-Eb1, Tasp1, Tusc3, Irf2bp2,  
 1700056E22Rik, Ppp6c, Slain2, Cnn3, 6030407O03Rik, Acbd6, Hmgb1, P2rx4, Cdk19,  
 1700061G19Rik, Tesk2, Plxnc1, Ercc3, 2010010A06Rik, Stk17b, Tspan9, Kcnj16, Ddx10, 40



Wnt16, Sp4, Hilpda, Slc38a6, Tgfbr2, Fggy, Sugct, Begain, Mnd1-ps, Ksr2, Eif2d, Ms4a4d,  
 Stim1, Cst10, Nfatc1, Ppifos, Gng7, Mir211, Txk, 4930415F15Rik, Tmem64, Stim1, Pip5k1b,  
 Kcnj15, Commd8, Mir3108, Atp11b, Stk17b, Emc3, Cldn10, Akap13, Abcb1a, Mthfd1l, Foxk1,  
 Rgs3, Gdnf, Micu1, Il7r, Arhgap35, Olfr1364, Ms4a4b, Rgs10, Flt3, Sfrp2, Il9r, Sfl, Gm1604b,  
 Galnt4, Dtnb, Supt20, Fntb, Zmynd11, Tulp3, 2410007B07Rik, Tsen15, Abhd2, Dgcr6, Filip11,  
 Ifit81, 4933401D09Rik, Gtdc1, Ano6, Mir1928, Peli1, Jak1, Cdk19, Syne1, Il23r, Tpm2,  
 Fam65b, Kidins220, Vav1, 9030617O03Rik, C1ql3, Ceacam9, Ehd2, Vtcn1, Dusp7, Pik3ip1, 10  
 Ostml, Ppard, Olfr372, Mir7032, Npy, Phxr4, Grap2, Thrb, Wipi1, Dock4, Mfsd6, Zmynd8,  
 Mylip, Setx, Ccdc146, Il12a, Sall3, Mir7048, Hapln1, Casp3, Bbs9, Syne1, Tdrd3,  
 4930565D16Rik, Gm20098, Tcf4, Haao, Snd1, Zfp706, Agfg1, Gm8709, Syne1,  
 4933406J10Rik, Pik3c2b, Manba, Olfr1033, Aurkb, 9330175E14Rik, Foxo1, Sfmbt2, Bach2,  
 Pogz, 4930459C07Rik, Phxr4, Map7d2, Gm20750, Il12b, Sesn3, Psen2, Suco, Mad2l1,  
 E030030I06Rik, Gadd45a, Abca1, Boll, 4930430F21Rik, Cstad, Lyst, Rasgrp4, 4833427F10Rik,  
 Ehd2, 4930445N18Rik, Ppm1h, Gltscr1, Irf8, Lgi1, Gm10432, H2-M10.1, Crtc3,  
 4930453N24Rik, Irs2, 1700042O10Rik, Rabgap1l, Rnf144a, Csk, Rpia, A430090L17Rik, 20  
 Mir8097, Serbp1, Mir684-1, Tcf4, Commd8, Tet3, Nr1i2, Gm10190, Prkcq, Orai2, Dpy30,  
 Sbk2, Tssc1, Cd5, Sipa1l2, Dcpl1a, 1810006J02Rik, Itgae, D030025E07Rik, Wibg, Bach2, Irf4,  
 Ctnnd1, Usp7, Rftn1, Themis, 4930440I19Rik, Thrb, Nr1d2, Tgtp1, Ccdc162, Atp8b2, Speer4f,  
 Stra8, Gm4906, Fam46c, Pag1, Etv3, Erdr1, Dhrrsx, Fam65b, Gosr1, Trem2, Fbln1, Sp3, Mef2a,  
 Bcor, Map4k4, Magi2, Pak2, Rph3al, Lgi4, Pja2, Tceal3, Efcab1l, Arhgap5, Ext1, Smyd3,  
 Prim2, Satb1, Stag2, Themis2, Pim1, Apol8, Lrrc6, Shb, Magi2, Commd8, Zfp879, Trp53i11,  
 Rgl1, Abcd3, Diap2, Zbtb2, C030016D13Rik, Arhgdib, A630075F10Rik, C730036E19Rik,  
 Phc2, Adamts10, Inpp4b, Cd200, Itpr2, Fgfr1, Gm5434, Scn2b, D8Ert82e, Gm2a, Ube2v1, 30  
 Bend4, Lpp, Mir181a-2, Gm13293, P2ry1, Klf7, E030018B13Rik, Rhobtb2, Ddr1, Ggnbp1,  
 Gimap7, Mamstr, Cmip, Setbp1, Fcgr4, Slc1a3, Zfp608, 2810403A07Rik, Gm7538, Mir378a,  
 Hoxa13, 2610301B20Rik, Ngly1, Sergef, Tpp2, Slc35b3, Maml3, Nav1, Txk, Fam195a, Scml4,  
 Tlr12, Gpr125, Zfp36l2, Suclg2, Tec, Akap2, Rab38, C030018K13Rik, 4933433H22Rik,  
 Osbpl11, Capn13, Ankrd50, Mir1928, Mir3108, Slc39a10, Dock2, Dip2c, Aebp2,  
 A530046M15Rik, Gm6251, Mtx2, Exoc4, Olig3, Dph6, Emb, Xpc, Gm7538, Tnfsf8, Afap1l2,  
 Cenpv, Gsn, Rbms2, E2f3, Smarcel, Foxp1, Slc37a3, Apbb1ip, Tex10, Bend4, Pcgf5, Trio,  
 Klf5, Gja8, E130006D01Rik, Ncor2, Acbd6, Alg14, Scmh1, D830013O20Rik, Galnt4, Ndufa6, 40

Timm8a2, 2210010C04Rik, 4931403E22Rik, Gys2, G630090E17Rik, Dapl1, Nup160, Fxyd7,  
 Zscan18, Bid, Serhl, Cdk17, Lrtm2, 3930402G23Rik, Tm2d1, Snora7a, C8g, Nkap,  
 2410007B07Rik, Ilf3, Mir7017, Gpr83, Thada, Ambra1, Fancc, B3galt4, Thns11, Etv5, Aox2,  
 Tgm2, Man1a, Edem1, Hnrnp1, Atp6v0e2, Clec4f, Hey1, Fam3c, Stat4, Slc46a1, Rps15a-ps6,  
 Kdm4c, Upb1, Sik1, Nceh1, Prkcq, Btg1, Galnt2, 2010010A06Rik, Neu3, Cubn, Mir1928,  
 Rapgef2, Nedd4l, Egfl7, B3gnt2, Tgtp2, Gm13546, Ext1, Pold4, Ggact, B3gnt7, Gm5868, Tlr7,  
 Lefty2, Npff, Tcf7l2, D130058E03, Pag1, 4930578N18Rik, 6430710C18Rik, Fam43a, Snora81, 10  
 Cyp20a1, 4922502D21Rik, Lsm1, Gm10791, Kcnh2, 1700109K24Rik, Nol6, 4922502D21Rik,  
 Trib2, Nrf1, Rgag4, 4930426L09Rik, Ppil3, Vmn2r96, Ngly1, 1810046K07Rik, Hid1, Olfr1510,  
 Nrip1, Dhdkd1, Ms4a6b, 4930583K01Rik, Atp1b3, Mir7046, St8sia1, Pcdh7, Micalcl,  
 D030024E09Rik, Pold4, Coro2b, Adamts14, Auh, Fus, Hcls1, Prkcq, Nim1k, Zdhhc14, Kcnh2,  
 Cd37, Ttc27, Olfm2, Ubac2, Mir6387, Zfp619, Zbtb9, Gpr125, Ppp2r5a, Adgb, Pard3, Ctrl,  
 Ddr1, Ckmt2, Lpar6, Sspn, Gm4792, 9430008C03Rik, Ngly1, Tbx19, Heatr1, Cdc14a, Nabp1,  
 8430436N08Rik, Cd247, L1ph, Pex10, Eea1, Lef1, Ly75, Dock11, Haao, Rgs3, Mnd1-ps,  
 Maml1, Stxbp1, Parp11, G530011O06Rik, Mgrn1, Ift57, Mef2a, A1427809, Ldhhb, Cdk19, 20  
 Lrrc3b, Osm, Dnajc15, Mirlet7i, Stk38, Cep170, Rcn3, Gramd1a, Mfng, Vgll4, 1700017N19Rik,  
 Atp1a3, Ptpla, Mir6962, Jun, Cdk19, Gm10638, Zfp36l2, Slc39a10, Tpd52, Mthfd11, Agbl1,  
 4922502D21Rik, Ceacam2, Drosha, Fut8, Cox10, Dnajb12, Thns12, Eefsec, Pgpep11,  
 4932441J04Rik, Fndc7, Clip1, 2700046G09Rik, Itpkb, Kremen1, Mpp6, Ccr9, Tbc1b, Rictor,  
 Gm3716, Icosl, Cpeb4, Mir7681, Kmt2c, Mak16, Gli1, Actl9, Gpatch2, Sept14, Aebp2, Phlpp1,  
 Zfp957, Ap3m2, Zcchc2, C030018K13Rik, Cdk17, Tmem217, Cog6, Dock2, Il7r, Crybb2,  
 Slc16a10, Ppp1r1b, E430016F16Rik, Fbxo17, Akr1d1, D10Jhu81e, Irgc1, Klf7, Pcdh7, Nipbl,  
 Rrn3, Mir7681, Arhgef33, Rhoq, Dusp5, Itga4, Palm2, Map10, Tigd2, Mfge8, Zfp580, Peli1, 30  
 Trim59, F730035M05Rik, Gpr110, Lyst, Slc10a4, C230029M16, Gpnmb, Rgs3, Rab3ip, Vps54,  
 Cox7a2l, Slc7a15, Serbp1, Slc22a16, Prkch, 4933433H22Rik, Arap2, Mkl1, Slc22a16, Fli1,  
 Stk24, Stard8, Arhgap29, Pcca, Trem12, Tssc1, Pgpep11, Syde2, A430107P09Rik, Foxo1,  
 8430436N08Rik, D030024E09Rik, Tcf7, Ifitm6, Ctso, Capzb, Lypd3, Lix1, Ccdc170, Tasp1,  
 Dnah7a, Sugt1, Pde7a, Pcnp, Klf5, Olfr1357, Ldhal6b, Kctd12b, Cxxc5, Pkn2, Mboat2, Angpt1,  
 N6amt2, Gm839, Bach1, Il2ra, Ankrd12, Ccdc64, Pptc7, Ikzf2, Svil, Tlr1, Rel1, Tma16, Mbnl1,  
 Cyfip2, Rps6ka2, Elovl6, Dapl1, Zfand3, Unc5cl, Zfp619, Sytl3, BC031361, Fam26e, Gm2799,  
 Chst15, LOC101055769, Sepp1, a, Ccdc171, Hemgn, Pik3c3, Lrp12, Capn11, Pvr, Prkcq, 40

4932702P03Rik, 2300002M23Rik, Tef, Foxp1, Lypd6b, 4933412E24Rik, Wnt4, Marco, Elfn2, Smim9, Dip2b, March2, Frs2, Olfr1507, Mir7219, Fbxl22, Vim, 4933432G23Rik, L3mbtl1, Mad1l1, Calr4, Lrrc3b, Strada, Mir363, Tspan9, Esrp1, Panx1, Tgfbr2, Emb, Spata3, Ext1, Calm2, AY512915, C530008M17Rik, Mitf, Wdr11, Mir5127, Selt, Gm6623, Gm684, Gm3716, Tgtp2, Sptb, Hamp2, Itgb6, Cd2ap, Prnp, Ift80, Slamf6, Pou2af1, Snx29, G530011O06Rik, Wipf2, Fam134b, 4930428G15Rik, Igl1l, Phxr4, Sgms2, Gm12159, Igf2bp3, Haao, Bai2, Sh3pxd2a, Scn4b, Eif4e3, Snx29, Tmem194b, Ifngr2, Gm5766, Zcchc24, Sox5os3, Efna5, Tecta, Mir7687, Mir6367, Itga4, Tns4, Ccm2, Wipf1, CerK, Znrf1, Elovl5, Phtf2, 1300002E11Rik, 2210417A02Rik, Mir7061, Grhpr, Mark4, 4930564C03Rik, Svopl, Pja2, Tfdp2, Rbm11, Usp6nl, Mir6368, A430107P09Rik, Bcl2, Cdc42se2, 4933433H22Rik, Apol8, Xpnpep2, Dach2, Mir205, Stard5, Fsbp, Rph3al, Vav3, Gm10125, Lpcat1, Cd2ap, Bank1, Smurf1, Aox2, C230029M16, Sgms1, Eci3, Xpnpep2, Pfkfb2, Utrn, Ldlrad3, Gabrr1, Kcna2, Ywhaz, Stard13, Atp10a, Slc39a10, Whsc1l1, Gm12522, Trio, Man1c1, Hmha1, Gm10791, Kidins220, Lad1, Mir1928, Gm13710, Mir1963, Lama4, Pard3, Susd3, Taok3, Skor2, Matn2, Tet2, Mir7674, Ccdc64b, Fam49b, 4933412E24Rik, Thsd1, Sall3, Papss2, Tceal3, Rreb1, Klrd1, Rgs3, Cst10, Itga4, Gm20098, Smarca4, Cyp2d22, Kdm6b, Cntn5, Dyrk2, Dusp10, Srpk2, Etv5, Slc25a25, Cfl2, Micu1, Ets1, Gm6559, Zfr, Mrpl52, CerK, D630010B17Rik, Ext1, Cblb, Gnai2, Apol7e, Manba, Dusp10, Smim8, Mir6907, Pard3, Tmem35, Ric8b, Gm14124, Pik3r1, Gm11981, Dip2c, Plin2, Fam228a, Tlr1, Lypd6b, Zc3h12b, Abcg1, Ext1, Camk2g, Ptgr2, Mnd1-ps, Rftn1, Sox8, Sdc3, Mab21l3, Arid1b, Tdrp, 4921525O09Rik, Arid4b, Micu2, Ly86, Afp, Grap2, Ist1, Sh2d4b, Rad52, Mir1668, Rpgr1p11, Gramd1a, Sgk1, Fos, Smad4, Hdac4, B3gnt3, Nr4a3, St8sia1, Psg-ps1, Actl9, Pdk1, Il2ra, Irf2, Fasl, Hsd1l, Galnt5, Itk, Maml2, Erdrl, Ndufa6, Tbc1d23, Slc43a2, Iqgap1, Klf7, Bend5, Klf4, Lif, Calr4, Cnst, Ifnk, G3bp2, Tbc1d2, C030034L19Rik, Zfhx3, Bcl11a, Retnlb, Ap3m1, Hlcs, Serpinf1, Gm16390, Wdr37, St8sia1, Cenpu, Gm10638, Tfpi, Fabp7, Wisp3, Psma1, Tet2, AI854703, Lmo4, Ppp1r1b, Mgat5, Foxp1, Gm3716, Mir6349, Tle4, Itgb8, Rab11fip4, Tbc1, Npepps, 1300002E11Rik, Celf2, 4933412E24Rik, 4930415F15Rik, Olfr1507, Itgb3, Bace1, 2010015L04Rik, Mir7656, Esrp1, Spred2, Myo10, A930001A20Rik, BC048403, Lincpint, Mturn, Shisa2, Mef2d, Rac2, Dusp6, Lef1, Tmem64, Lrig1, Atp6v1g1, 1700017N19Rik, Dfna5, Zfp286, Gimap9, Gbe1, Cdc37, Pard6g, Serp2, Pid1, 4930465M20Rik, P2rx4, Opalin, Mir684-1, Ngly1, Ndufa4, Mir16-2, Trib2, Slc17a9, Itpripl1, Uri1, Rnf32, Prlr, Lyrm7, Fbln1, Nenf, At12, Slfn1, Supt20, Ski, Pno1,

10

20

30

40

Foxo1, Olig3, 5330411J11Rik, Eci3, Clic4, Naa30, Abca1, Mpp1, Adcy6, Ptpre, Fbxo27,  
 Ahcy12, 1700016K19Rik, Gm14405, Drosha, Lrrc1, Mir7014, Cdk19, Ldlrap1, Pgpep11, Fgl2,  
 Nck2, Acvr2a, Myo10, Cblb, Gm590, Kcnq5, Col6a1, 4930480M12Rik, Rad23b, Tram2, Pygo1,  
 Mir6368, A430107P09Rik, Afap1, Pip4k2a, Slc46a2, Mgat5, Slc27a6, Ntpcr, Cuedc1, Ramp1,  
 Enthd1, Mir6374, Stmn1-rs1, Gm684, Fbln1, Lef1, Chd7, Ppp1r3fos, Abi1, Plau, Aif11, Tesc,  
 Edem3, Tbccl, Prdm5, Lnpep, Dyrk2, Gm6260, 4930428G15Rik, Carns1, 8430436N08Rik,  
 Plekha5, Hexim2, Ccr7, Foxp1, Satb1, Rpgr1, Dnm3os, Retnlb, Tram1, Tmppe, Car12, 10  
 Snord14c, Ets1, Crtc3, Kcnh8, Hey1, Slc44a2, Dip2c, Ankrd44, C230029M16, Nwd1, Mrps11,  
 Cpb1, 4930567H12Rik, Mir378c, Dnaja2, Fnbp11, Tab3, Zap70, Cenpk, Bear3, Usp6nl, Ppp4r2,  
 Has1, Tbcd22a, Dync2li1, BC055111, Sepw1, Ap1s3, Ass1, Metrnl, Rsph3a, Dpysl2, Rapgef6,  
 Cxcr4, Mir8095, Sgsm3, Actn1, Grb10, Slpr1, Rasgrp1, Dnajc6, Agfg1, Map3k15,  
 4930465M20Rik, Csnk1g3, Trpv5, Klf3, Zfp3612, Mir181a-1, Slc30a9, Taf3, Eml2, Tssc1,  
 1190002N15Rik, Cdh26, Sav1, Ghssr, Msra, Fam134b, Tusc3, Itpkb, Dtw2, Frmd7, Gm20750,  
 4933440M02Rik, St8sia1, Mir8105, Mir7681, Sntg1, Hipk2, Cd8b1, Stk24, Zmat4, Pnoc, Creb1,  
 Trps1, Glis, Gm15706, Ubtd2, Kif1b, Pex3, Ect2l, 4732490B19Rik, Calm2, Syne1, Ap1b1, Ldha, 20  
 Mmp15, Tnks, Gm20098, Spred2, Igf2bp3, Atp1a3, Pdzn3, Qser1, Ppm11, D930032P07Rik,  
 Vmn2r98, G530011O06Rik, Ikzf1, D630010B17Rik, Mettl8, Gm590, Enthd1, Ccdc152, Ywhaq,  
 Atp8a2, Thra, Ildr1, Rpap3, Ltb, Rev3l, Med13l, Dner, Ralgps2, 4930428G15Rik, Dnajc1,  
 Arhgap6, Fam101b, Nfam1, Ccr7, Psma6, Gm1631, Hadh, 3425401B19Rik, Irf4, Zak, Brdt,  
 Fam71f2, Slc25a12, Ippk, Fnbp11, Rps16, 4930540M03Rik, Cd5, Ube2e1, A430107P09Rik,  
 Rapgef4, Olfr1507, Rmdn2, Lhfp, Mir1893, Lgals3, Gnl3l, Whsc11l, Sh2d1a, BC061194,  
 Mbnl2, Zbtb38, Golph3, 4930430F21Rik, H2-Q1, Ntrk3, Ninj2, Cd3e, Stat5b, Lbx1,  
 4933412E24Rik, Pten, Gm2447, Mtx2, Tmcc3, Lin28a, Cyb5a, Znrf1, Fance, 1500015O10Rik, 30  
 Plekho1, Prss32, Gjd2, Gphb5, Ccr7, 4931403G20Rik, Mboat1, Dyrk2, Il9r, Sos1, Etv2, Txnip,  
 Fam110b, Rph3al, Mboat4, Plekhh2, Irf6, Thoc7, Yeats4, A430107P09Rik, Ms4a7,  
 4930567H12Rik, Zfp930, Zap70, Uaca, Nsg2, Myo10, Ctf1, AU015836, Mir7681,  
 9830132P13Rik, 1700021F07Rik, Ipo4, Icosl, Smad5, Cyp26b1, Mgarp, A430078G23Rik,  
 Kdm6a, I730028E13Rik, Hs2st1, Tox, Akr1d1, 1810010D01Rik, Rpl34, Ramp1, Hcls1, Rab3ip,  
 4930445N18Rik, Extl3, Sox4, Gjd3, Gm14305, 1700061F12Rik, Lnpep, Wnt5b, Mark4,  
 Stmnd1, Olfr1507, A430107P09Rik, Commd8, AI427809, Mir6979, Cdc42se2, Gpr125, Tcf25,  
 Taf8, Lclat1, Wdr89, Ptk2b, Pitpn, Ttf2, St6gal1, Maml2, Lrch3, 5430427M07Rik, Bach1, 40

Exoc4, Mef2d, Vps37b, Wdr37, Ccr7, Fam221a, Mif, Vmn1r157, Mpp6, Chd2, Sept6, She,  
 Prg4, Snord83b, Gm7616, 2410114N07Rik, Wdr37, Gdpd4, Vdac1, Mir5104, Rsrc1,  
 4930523C07Rik, Akap2, Lyst, G6pc2, Klhl4, Slc35b4, Setbp1, Akap2, 1700072O05Rik,  
 Gm1604b, Kcna10, Stambp11, Npas2, Dnajc1, Ddx25, 4933433H22Rik, Plcg2, 4930562F07Rik,  
 Armc4, Foxo1, Samd9l, Gm16157, Gpnmb, Tmem141, Mir6413, Gabbr2, Fgf8, Prdm2, Ikzf3,  
 Diexf, Ccdc8, Esd, Macrodl, Tm2d1, 4930572O13Rik, A130077B15Rik, Lck, Kdm2a, Rbbp8,  
 Cd47, Gm6578, Klf2, Zfp536, Ube2e3, Aff3, Man1a, 4930413G21Rik, Crtam, Rpa1, Kcnh3, 10  
 2900008C10Rik, Tbc1d31, Snn, Malat1, Bambi-ps1, Wisp3, Mrgprb5, Gch1, Nabp1, Mettl9,  
 Zfp3612, Mir7669, 4933401H06Rik, Prkrir, Erdr1, Olfr630, Tmem168, Gbp11, Mbnl1, Plin2,  
 Scn2b, Car8, Ngly1, Kcna2, Dpp6, BC027231, Gosr1, 1700016L21Rik, Ccdc170, Manba,  
 Osbpl9, Purb, Rftn2, Klf3, Cdca7l, Supt7l, Rgs3, Rbpms, Mir6349, 5830418P13Rik, Pkn2,  
 Baspl1, Btg2, Ifnk, 5730403I07Rik, Srsf1, Kif3a, Fbxo27, Gipr, Colq, 4930540M03Rik, Pard6g,  
 Bcl11a, Ezh1, Cd2, Foxq1, Rybp, Pgap1, Usp10, Sh3bp5, Pmp22, Sdc3, Rnf145, Ankrd44,  
 Tacc2, Sh3bp4, 4930465M20Rik, Slc19a3, Gm10791, Map4k4, Bhmt, Gm10190, Zdhhc18,  
 Mroh2b, Gpr3, Tgfb2, Reck, Atxn7l3b, Ngly1, Il12rb1, Gucy2c, Gpr83, 1700025G04Rik, 20  
 Arap1, Chrm3, 8430436N08Rik, Postn, Lonp2, Ly6d, Zfp516, Fam102b, Psap, Rere, Fam217a,  
 Cox4i1, Slc7a1, C9, Mir6374, Mdm1, 2310043L19Rik, Fbxl17, Gm5468, Panx1, Sct, Racgap1,  
 Ppm1b, Samd12, E330009J07Rik, Cd101, Zcchc2, Gadl1, Rapgef6, Steap3, Fgfr1op, Setd7,  
 3110056K07Rik, Gm5538, Ino80e, St6gal1, Nsmce1, Ccdc64, Cxcr4, Gata3, CerK, Chst15,  
 Mir3089, Map4k4, Akap13, Slc30a9, Gm10790, Npffr1, Tdrp, Gm20098, Ddhd2, St8sia6, Lhx2,  
 Syt6, Dtl, Themis, Maml2, Sh3bgrl2, Sptbn1, Fam207a, Lmna, Nfatc2, Gm12185, Arhgap6,  
 Atg14, Macrodl, Mir3110, Fam46c, Wdr63, Ppp2r1b, Prdm9, Lphn2, Mir574, Il9, Elovl6, Chd7,  
 Pitpna, Atoh7, Mc2r, Celf2, Tdrd3, Rassf2, Gm10640, Ncoa3, Lyst, Fyb, Gm2447, Aplar, 30  
 Stag2, Foxp1, Rock2, Pdlim1, Bin1, Gm10125, Bach2, Fbxl22, 2900005J15Rik, Rgs2, Cldn10,  
 Lrrc8d, Rad23b, Supt20, Dgkd, Atn1, Agtr1a, Pias2, Gm10791, Tmem60, Prkag2, P4ha2, Trat1,  
 March5, Tcf7, Wbscr27, Gm6498, Hist1h2bn, Zfp120, Trub1, Mir1936, Ms4a7, Nfatc4, Lrrn3,  
 Trat1, Sox4, Nhsl1, Lincenc1, Tmem243, St6gal1, Dpysl2, Cntln, Il7r, Olfr9, Erbb2ip, Rpl10l,  
 Mir211, Srbdl, Lphn2, Fam3c, Sorcs2, Thrb, Katnal1, Mir199a-1, Fbxo32, Rpap3, Arfip1,  
 Rpl19, Itm2a, Trim56, Ier5l, Btg1, Plekhl1, Rpl34, Pik3r1, Mir6349, Ikbkb, Cntn5, Sh3kbp1,  
 Btg1, Cd101, 4930523C07Rik, Qsox2, Serhl, Rfc1, Cga, Bmyc, Sla, Rev3l, Fam134b, Ggact,  
 Mir466o, 28-Feb, Akr1d1, Tnfsf11, 2310040G24Rik, Gclc, Pde4b, Dgkz, Hsbp1, Eif3k, Gipc3, 40

Mthfd11, P2ry1, Ets1, Cxcr4, Pja1, Trem12, Ccr7, C230024C17Rik, Rps6ka5, Klf4, Cx3cr1,  
 Echdc3, Hspa8, Lama4, Mgl1, Ophn1, Thns11, Disc1, Pdzn3, Sms, Zfp704, Zfp3612, Fam105a,  
 Mad211, Dazap2, Fbxl14, Vapb, Ifnab, Zgfr1, Rtkn2, Ppp2r3c, Vmn2r96, Bbs9, Ifnlr1,  
 1700064J06Rik, Ppp1r37, Tgfr2, Slc2a2, Lef1, Ccr7, Foxq1, Gan, D6Ert527e, Snx9, Hes7,  
 Fbxo47, Cox10, Bend3, Sgms1, Slc30a9, Gm3716, Foxo1, Rsb11, Tmc1, Fam120a, Gpr18,  
 Efhc1, Ramp3, She, Akap7, Vezf1, Dnajc3, Tnp1, Nudt16l1, Gm19589, Ankrd60, Txk, Lix1,  
 Dnajc6, Serinc5, Lef1, Tars, Gm3336, Bace1, Nedd4l, Trib2, Gm6994, Bcl11a, Mir5127, 10  
 Klrb1b, Nfix, Tigd2, Map4k2, Uxs1, Bach2, 4930583K01Rik, Klhdc9, Eepd1, Als2cl, Pard3,  
 Wdr27, Ikzf1, Btg1, Ly6e, Prm1, Taco1, Itpr2, Limk2, Bend4, Gtf3c3, Kcnh8, Cd96, Fam229b,  
 Adamts14, Lym7, Fhit, Sqr1, Fpr-rs4, Tmem260, Cd55, Mir214, Mir3093, Amigo2, Dapp1,  
 C030018K13Rik, A230028O05Rik, Shf, Lef1, Nrp1, Efr3a, Tmem30b, Mynn, Tgfr2, Nfia,  
 Ipce1, At12, Thpo, Fam49a, Mir6387, Rtkn2, Gucy1a3, Chrna9, Rassf2, Clip4, Wnt10a, Opalin,  
 Llph, Mir6995, Sorcs2, Slc2a2, Gm20110, Syne1, 2810001G20Rik, 5430434I15Rik, Ppp1r37,  
 Itgb6, Hspa8, Il9r, Glrp1, 5430421F17Rik, Tstd2, Zswim2, Ext1, Slc16a10, Zfp957, Slfn5,  
 Lrch1, Scin, Card11, Ext1, Tet1, Scml4, Diap2, 4933433H22Rik, Zfp629, Tspan13, Prkcq, 20  
 Zcchc13, Cd74, E330017L17Rik, Tm2d1, Gpr126, Nrn1, Fam124b, Tubb2a, Tdrp, Tnfrsf1a,  
 Foxp1, Fam107b, Epb4.115, Fam78a, Rasal2, Mapk9, Creb3l2, 4930539M17Rik, Kcmf1,  
 Ctage5, Ankrd12, Manba, Tmc1, Lman11, Nacad, Agr3, 4933433H22Rik, Matk, H2bfm, Kcnh2,  
 Pgr15l, Inpp4b, Kcmf1, 4933430N04Rik, Vmn2r92, Stk17b, Foxp1, Cep57l1, Lix1, Kcna10,  
 Vangl2, Treh, Enthd1, Gm6559, Brf2, 4921525O09Rik, Prkcq, Igsf3, Fut8, Limk2,  
 5730508B09Rik, Clasp2, Twsg1, Tmem126b, Hoxa7, Cd28, Sh3bp5, Furin, 1700001P01Rik,  
 Diap2, Tecta, Icosl, F11r, Mir7023, Fes, Map3k5, Spry4, Cd44, Ralgps1, Gm16793, Alox5ap,  
 Mir5098, Arid1b, Ugcg, Ctla4, Snx9, Mir8095, Isl2, Osbp16, Dyrk1a, Cd300a, A930011G23Rik, 30  
 Fam26e, Ikzf2, Enpp6, Mir181a-1, Lyst, Grhl2, Aldh1a7, Hmgb1-rs17, 2410004B18Rik, Dnm2,  
 Nabp1, Foxp1, Tnfrsf10b, Prkcq, Sgsm3, Agr3, 1700017N19Rik, Tle3, 4933406K04Rik, Insr,  
 Whrn, Ets1, Lef1, Mir5618, Soat1, Ccr7, Cmss1, Ahcy12, Mgat1, Hspa13, Znrf2, Kcnh8, Tdrp,  
 Gm1604b, Vmn2r95, Akap6, Tbc1d22a, Lbp, Mkl1, Rsu1, Sstr2, Slc37a3, Ube2d2a, Itpka,  
 Rnf220, Hnrnp2, Gm2933, Akap2, Pdzk1p1, Wwp1, Vapb, Dyrk1a, Dynl1b, Zfp365, Ssh2,  
 R3hdm1, Nek10, Zswim2, Ccdc90b, Znrf1, Ms4a5, 4933406K04Rik, Actr2, Rgmb, Ston2, Gnas,  
 Stk17b, Pim1, Mtr, Klhl2, Cdk15, H2-Ob, Il23r, Slain2, Tssc1, Sbk1, Ube4a, H2-T3, Gtf2ird1,  
 Tyw5, Hbs11, Efhc1, Rpe, March6, Itga4, Fam13a, Lst1, Ankrd55, Nif3l1, Fam69b, Mir7674, 40

2810001G20Rik, Gpr19, 4930567H12Rik, Foxp1, Dgkz, Cenpf, Amigo2, Panx1, B4galt3, Pag1,  
 Ubl3, 1110059E24Rik, Hs1bp3, Slc6a19os, Mdm1, Limd2, Slc6a19, Bank1, Alg13, Wisp3,  
 Sult5a1, Fam86, Dennd2d, Cacnb2, Tesc, Mdm1, Adipoq, 1810026B05Rik, Mir325,  
 1700096J18Rik, D030024E09Rik, G0s2, Mir7219, Slpr1, Cxcr1, Ext1, Chd1, Ly86, Dhx40,  
 4930564D02Rik, Dctn6, Il7r, E230025N22Rik, Sgk3, Bach2, Ramp1, Syt6, Gsap, Ccdc152,  
 Jakmip1, Atp8a1, Grap2, Dynl1f, 4921513I03Rik, Gpc6, Kcna10, Ipcef1, Mir7061, Btg1,  
 Stoml1, Zfand3, Aqp4, Zfp281, Ccr2, Nrip3, C230029M16, Tcf4, Hadh, Mthfd11, Lhfp, Gpr114, 10  
 Plbd1, 1110034G24Rik, Cd79a, Gse1, Churc1, Map3k7cl, Filip11, Galnt7, Appl2, March5,  
 Zswim6, Skap1, Tgfb3, Slc16a2, Palld, Atg10, Cap2, Dfna5, Tlr7, Slc24a1, Hivep2, Dock4,  
 Cd300a, Igf2bp2, A430107P09Rik, Lrrn3, March2, Gm21057, Apbb1ip, Piga, Zbp1,  
 A430107P09Rik, Trappc8, Zdhhc14, Stk17b, Sh3pxd2a, Ppifos, Chd1, Socs1, Kdr, Gramd3,  
 Urad, Sipa111, Gm20098, P2ry2, Gas8, Sox5os3, Ccdc117, A130077B15Rik, Basp1, Zfp365,  
 Syde2, Laptm4b, Sik1, 4933433H22Rik, Npff, Arntl, Alb, Zmynd11, Gm20098, Il9, Hadh,  
 Sstr2, Emp1, Lef1, Galnt10, 5430434I15Rik, Cmah, 4631405J19Rik, Hesx1, Gm16793, Rplp0,  
 Sall3, Xdh, St8sia1, Folr4, Sp3, Rassf3, Aox2, Emp1, Rragc, Proser2, Gm8817, 20  
 D030028A08Rik, Btg1, Mad21l, Upb1, 1810006J02Rik, 4932702P03Rik, Rhoh, Gm10790,  
 Dock10, Fam166b, Pcdh1, Zbtb24, Camk1g, 4933407L21Rik, Pde7a, A430093F15Rik, Pmepa1,  
 Ropn11, Grap2, Rims3, Rps6ka1, Eps15, 4930445N18Rik, 6430710C18Rik, Ppp1r13b, Il21r,  
 Mtmr2, Prex2, Atp6v0d2, Ablim1, Hnrnpd, Syde1, Slc16a1, Mbnl1, Sgms1, H2-DMb1, Ly6a,  
 Tlr1, Gm20098, Galnt5, Edem1, Fam173b, Gpr126, Nbeal1, Prlr, Tmc1, Csrnp1, Atp10a,  
 Dusp4, Lpar6, Pitpnb, Actr2, Ago2, Lphn2, Gm2447, Myo18a, Cd101, Cngb1, 1700027J07Rik,  
 Vmn2r91, Folr4, Satb1, Man2a2, Smim14, 3300005D01Rik, D130058E03, Angptl2, Ercc3,  
 Tmem87a, Syne1, Ptrf, Gm2447, Zscan2, Bend4, Endod1, Tgfb3, Mir6962, Rragd, 30  
 4931403G20Rik, Ddr1, Map4k3, Fabp4, Stk17b, Gm5122, Rapgef4, Neurl1b, Pdgfrb, Cirh1a,  
 Fnip1, E030002O03Rik, Fam65b, H2-DMa, Btg1, Zc3h12b, Prkch, Sipa111, Tdrp, Adtrp,  
 Fam129c, Runx3, Ilvbl, Tbx19, Filip11, A430107P09Rik, Ccdc11, Lphn2, Spg11, Mir6395,  
 Foxp1, Dtnb, Mrpl13, Egl3, Fpr1, Rapgef4, A130077B15Rik, Tlr7, Rbpms, Gm1966,  
 Tmem150b, Rev3l, Mad21l, Gm1604b, Tasp1, Slc19a3, Trappc10, Ralgps2, Npas1, Ptpns,  
 Slc36a1os, Maf, Wdr12, Polr3k, Gm20750, D14Ertd670e, Fam46c, Fam46c, Ptger1, Lclatl,  
 Ptma, Actn2, Tspan11, Zfp879, Spred2, Satb1, Nabp1, 4930486L24Rik, Ugcg, Txk,  
 A430107P09Rik, Hadh, Abtb2, Rbm33, Fli1, Fyn, Mgat4a, Snd1, Glt8d2, H2bfm, 40

9130401M01Rik, Snd1, Mir3079, Pcdh7, Cnga1, Tldc1, Ugdh, Aven, Mir8104, Rgl1, Sox6,  
 Map3k14, Akirin2, Mir684-2, Rfx2, Fyb, Ccdc711, Ece1, Gm8884, 4921507P07Rik, Mir6933,  
 Slc6a7, Cox7b2, Rfx4, Gm5617, Sh3kbp1, Pds5a, 9030617O03Rik, Gpr126, Ctnnb1, Prpf40a,  
 Gpr22, Cldn10, Cdk19, Sgk3, Rgs3, Mir6995, Cdon, Stk17b, Samhd1, Gm16793, Lag3, Olfm2,  
 Cyb5a, Zfp438, Akap2, Dpfl, 3110052M02Rik, Lrp6, Haao, Camk2a, Tspan9, 5430434I15Rik,  
 Stk24, Tlr12, A930005H10Rik, Slc4a4, U2af1, Fbxl21, Opalin, Rybp, Igsf3, Aim1, Wasf2,  
 Rgs3, Frs2, Smok4a, Pak4, Zscan22, A430107P09Rik, Slc35b3, Serpinb5, Med30, Cdc16, 10  
 Agfg1, Tmem261, Plxna1, Myo5c, Gpr183, Suclg1, Cdk19, 4930556N09Rik, Lpp, Tmem260,  
 Ubqln2, Mir378b, Btla, Gm19589, Ano6, Clint1, Ube4b, Olfr1507, Rab33a, 4930523C07Rik,  
 St6gal1, 1600014K23Rik, Nnmt, Ift80, Htr3b, Rpl34, Ipcef1, Psma6, Dnmt3a, Hpgds, Stxbp3a,  
 Mir6907, 1700056E22Rik, Smad7, Mir7078, Mir181b-2, Il27ra, Stat1, C030018K13Rik, Foxq1,  
 Hpcal1, Msra, Zc3hav1, Tdrd6, Tnfrsf4, 4921517D22Rik, Rubie, Plekhg6, Brd4, Sort1, U90926,  
 4930519F09Rik, Il4ra, Smyd2, Prkch, March9, Ghssr, Rps6ka2, Rpp21, Vps13c,  
 1600002D24Rik, Fam136a, 4921511I17Rik, Spefl, Maml3, St8sia1, Ssbp2, Stk4, Tnfrsf19,  
 Snord104, Olfr1507, Dysf, Cntn5, Cd2, Raver2, Gm10790, Pja1, Tmprss9, Klf5, Ubash3b, Tle3, 20  
 Scml4, Snx4, Tert, Sptbn1, Mir326, Aff1, Gm8298, Ephb2, Tec, F3, Exoc6, Sema4f, Dennd1a,  
 Gmcl1, Gm10532, St3gal1, Chd7, Gm6268, Tox, Pja2, Klhl3, Dnajc10, Foxp1, Trp53inp1,  
 Gtf3c3, Scd2, At12, Dach2, Lynx1, Cand1, Cxcr4, Gm20098, Fscn3, Il9r, Dph5, Sh3bp5,  
 St6gal1, Fli1, Mir5127, Ubac1, Gm16793, Nsmf, Sp6, Rnf145, Ccr7, Orail, Serbp1,  
 St6galnac5, Tox, Cacna1b, A430035B10Rik, Alpl, H2-DMb2, Etnk1, Olfr1507, Mtr, Rgmb,  
 Pmp22, Dctn6, Fli1, Mir326, Slc17a7, Sepp1, Slc6a19, Cngb1, Mir7681, Ccr9, Klhl4, Atp6v1g3,  
 Clec16a, Speer2, Gsn, Umps, Unc5cl, Aox2, Dcaf8, Igf2bp3, Car2, Rnf43, Kdm7a, Tgfb3, Eldr,  
 BC094916, Unc80, Zmynd11, Nabp1, Adamts14, Gm20139, Fgfr1, Tmem141, C130026L21Rik, 30  
 D630039A03Rik, Mturn, Herc3, Gm5468, Mir6398, Fam86, Nsg2, Cblb, Erbb4, Mir7-2,  
 Smurf1, Clec16a, Lhx2, Tomm20, Ifngr2, Acacb, Gm10791, Bach1, Epb4.1l2, Tmem154, Tssc1,  
 Vdac1, Itgae, Raph1, Klf3, Pnrc1, Sell, Tdrp, Ptk2, A630072M18Rik, Slc41a3, Rab11b,  
 Tnfrsf10b, Lrp12, Ptger3, Aggf1, 1700029F12Rik, Dpfl, Gm14295, Ubqln2, Coq2, Txndc8,  
 P2ry1, 4933430H16Rik, Tctex1d1, Sfmbt2, Alg14, Thal, Ets1, Cd101, Neu3, Mob3b, Kcna2,  
 Irs2, Mbnl1, Fntb, Nipbl, Slc16a5, Ccdc174, Ncs1, BC037032, Fryl, Lipa, Hs1bp3, Cd101,  
 Chd1, Atad1, Ppp1r3fos, Pde4b, Lamtor3, Klf2, Ttc27, Dntt, 5830454E08Rik, Panx1, Cyp2r1,  
 Rhou, Mir701, Ccr7, Arhgap26, Ankrd36, Retnlb, Themis, Med13l, Slc6a19os, Znrf2, Mettl8, 40  
 Mir3108, D030025E07Rik, Mir145b, Iqsec1, Cd8b1, Clic1, 1810026B05Rik, Ptprs, Med7,  
 Mthfd1l, Dnalil, Bach1, Mgmt, Ppm1b, 4933430H16Rik, Cd40lg, Txk, Cdc14a, Il9r, Slc7a15,  
 Prkch, Srpk2, Tmbim7, Rcor1, Vt1a, B3gnt2, Tmem261, Gria3, Tusc3, Rgs3, Satb1, Sept6,  
 Setbp1, Cep68, Ric8b, Il6ra, Znrf2, Lypd6b, Tmem29, Myh9, 4921511I17Rik, Dlx1, Lhx2, および  
 Chst15  
 のうちの少なくとも 1 つを含む。  
 【 0 1 6 7 】



T<sub>EX</sub>においてユニークに発現される遺伝子のシグネチャは本明細書において同定される。特定の実施形態において、T<sub>EX</sub>においてユニークに発現される遺伝子のシグネチャは、以下：

EHMT2, KDM4A, RAD54L2, PHF8, SIRT2, ATF2, KDM3B, TET2, BRD4, KDM2B, BRD9, MINA, SMARCA1, HDAC2, TRIM28, KDM5C, CARM1, EHMT1, JMJD8, CHD1L, BRPF1, SETD1A, CHD4, SETDB1, NAT10, SIRT7, BRD8, HLTF, PBRM1, SETDB2, SUV39H2, EZH2, HELLS, ATAD2, RAD54L, SETD8, HAT1, RPA3, SMYD2, TAF1, BRD7, HDAC3, TTF2, BAZ1B, SUV39H1, HDAC1, SMARCA4, BRD3, FEV, JMJD6, ACAT1, SETD6, SETD4, CLOCK, SMYD3, KDM6B, KDM6A, SIRT1, SMARCA1, HDAC5, SP100, ELP3, KAT2A, INO80, CHD3, KDM4B, HDAC8, SETD1B, HDAC7, SETD7, TET1, ZMYND11, CHD8, CREBBP, SHPRH, TET3, HDAC4, NSD1, TRIM33, ERCC6, PHIP, BRD1, KAT2B, CHD1, EP400, NCOA2, BAZ2A, JARID2, SETD5, SUV420H2, ATRX, ZMYND8, HIF1AN, BRPF3, KDM5A, TRIM24, KDM4C, BRD2, CHD9, EZH1, BRWD1, SMARCA2, KDM5B, PRDM2, CHD2, SUV420H1, ASH1L, BPTF, CHD6, KDM3A, EP300, SETD2, JMJD1C, ATAD2B, BAZ2B, BRWD3, JMJD4, CHD5, および PHF2

10

20

のうちの少なくとも1つを含む。T<sub>EX</sub>に特異的な転写およびエピジェネティックな変化の異種間同定を組み合わせた新規のアプローチを用いた。マウスのリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) モデルにおいて、正規T細胞集団 (ナイーブ、エフェクター、メモリーT細胞) と比較してT<sub>EX</sub>において特異的に上方制御される遺伝子を同定した。この遺伝子のセットの中で、オープンクロマチン領域内でユニークなT<sub>EX</sub>特異的なエピジェネティック変化を有するサブセットを、ATAC-seq分析に基づいてさらに選択した (Pauken et al 2016 Science)。エピジェネティックに選択された遺伝子は、シグネチャ富化のリーディングエッジで典型的に蓄積する他のデータセットで富化を駆動するため、このシグネチャは、以前の疲弊シグネチャよりも優れる。

30

【0168】

#### エピゲノムアッセイ

本明細書で使用される場合、「エピゲノムアッセイ」は、細胞、たとえば、T細胞、たとえば、疲弊したT細胞のエピゲノムのエピゲノムシグネチャを同定することができるものである。本明細書で使用される「エピゲノムの (エピゲノミック) に選択された」とは、比較トランスクリプトミクスの組み合わせを用いて疲弊T細胞の高度に特異的な転写シグネチャを導き出し、その遺伝子セットをエピジェネティックデータを介してフィルタリングして、疲弊T細胞によって特異的に発現された、疲弊特異的なエピジェネティックな変化を有する遺伝子を選択する場合である。エピゲノミックに選択された遺伝子セットは、高パラメーターマスサイトメトリーパネルを含むエピゲノムアッセイを生成するために用いられる。特定の実施形態では、エピゲノムアッセイは、サイトメトリーアッセイ、たとえば、マスサイトメトリーアッセイである。特定の実施形態では、サイトメトリーアッセイは、高パラメーター (たとえば、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、または130パラメーター) サイトメトリーアッセイである。特定の実施形態では、高パラメーターサイトメトリーアッセイは、45パラメーターサイトメトリーアッセイである。特定の実施形態では、高パラメーターサイトメトリーアッセイは、30パラメーターサイトメトリーアッセイである。

40

【0169】

T<sub>EX</sub>は、チェックポイント遮断および癌のためのその他の免疫療法の主要な標的であり

50

、慢性感染症および自己免疫のための治療法にも役割を果たす可能性がある。それらの治療上の重要性にもかかわらず、この分野における主要な問題は、これらの細胞を特異的に同定、追跡できず、それらの挙動および機能的可能性の変化を監視できないことである。この開示は、これらの細胞を同定および追跡するための方法を供する。本発明は、1～2マーカーのみに焦点を合わせた以前のアプローチより優れている。なぜなら、これらのアプローチは他の種類の細胞から $T_{EX}$ を区別せず、本アプローチは高次元に基づくこれらの細胞の挙動に関する実質的により多くの情報を供するからである。この後者の特徴により、 $T_{EX}$ の変化を疾患の状態および治療応答に関連付けることができた。このシグネチャおよびサイトメトリーアプローチの使用は、診断訪問から癌のモニタリングに至るまでの疲弊に対する血液ベースの免疫プロファイリングにとって興味深いものであるはずである。特に、免疫療法試験を実施している企業、および新規の免疫療法アプローチを開発しようとしている企業は、免疫療法の代替および標的としての $T_{EX}$ の不均一性を分析することに関心を持つべきである。

10

【0170】

#### プロテオミクスおよびプロテオミック同定

プロテオミクスはタンパク質の大規模研究である。プロテームは、生物またはシステムによって生産または改変されるタンパク質のセット全体である。プロテオミクスは一般にタンパク質の大規模な実験分析を指すが、タンパク質の精製および質量分析のためにしばしば特に用いられる。「プロテオミクス同定」という用語は、タンパク質の同定を指す。タンパク質は、たとえば、マスサイトメトリーなどのさまざまな技術を用いて同定される。

20

【0171】

#### オープンクロマチン領域 (OCR) ライブラリーおよびOCRフットプリンティング

クロマチンアクセス可能な領域は、分子および調節要素、たとえば、転写因子、酵素、たとえば、クロマチン修飾酵素などにアクセスできる細胞内のクロマチンの領域である。クロマチンアクセス可能な領域内には、クロマチンアクセス可能なゲノム遺伝子調節領域、たとえば、エンハンサーおよび/またはサプレッサーがある。

【0172】

本発明の戦略は、 $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、および/または $T_{MEM}$ と比較して $T_{EX}$ にユニークであるオープンクロマチン領域 (OCR) を同定し、それにより、細胞、たとえば、 $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、および/または $T_{MEM}$ 、 $T_{EX}$ の集団のためのOCRライブラリーを生成することである。OCRライブラリーは、T細胞の集団内のオープンクロマチン領域からなる。PCR法は、 $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、および/または $T_{MEM}$ 、 $T_{EX}$ などのT細胞の集団における特定のエンハンサー領域における「開放性 (openness) の状態」を評価するために用いられる。この方法により、細胞の集団におけるオープンクロマチン領域に存在するエンハンサーを特定することができる。OCRフットプリントは、細胞の集団のOCRライブラリー内の識別エンハンサーによって生成される。 $T_{EX}$ の集団のOCRフットプリントを対照T細胞の集団のOCRフットプリントと比較すると、 $T_{EX}$ 集団にユニークであるエンハンサー状態が同定される。細胞、たとえば、T細胞のエンハンサー状態は、本質的に、細胞のエンハンサー特異的エピゲノムのシグネチャまたはエンハンサープロファイルである。

30

40

【0173】

#### エンハンサー状態

T細胞のエンハンサー状態を決定するために、オープンクロマチン領域を調べた。細胞のエンハンサー状態とは、細胞のエピゲノム内のエンハンサーがオープンクロマチン領域 (OCR) にあり、それゆえ他のタンパク質にアクセスできることを指す。

【0174】

#### 定量的PCR

本明細書では、エピジェネティック/エピゲノムの状態、エンハンサー状態、および治療的調節を調査するために、エンハンサー開放性PCRアッセイを用いる。アッセイは次のステップで構成される：末梢血単離；CD8+ T細胞富化；細胞溶解；クロマチン放出；

50

転位反応およびライブラリー生成；プライマーのテストおよび選択のための関連OCRライブラリーの編集；サンプルOCRのqPCR読み出し；および複数の並列qPCRまたはアレイベースのプラットフォームによるハイスループットテスト：疾患の存在／不在、疾患の重症度、および／または治療への応答に関連するCD8+ T細胞の変化に関連するオープンまたはクローズのOCR状態。

【0175】

#### 疾患

T細胞の疲弊は、通常、エフェクター機能の進行的および階層的喪失、複数の抑制性受容体の持続的なアップレギュレーションおよび同時発現、主要な転写因子の発現およびと使用の変化、代謝攪乱、ならびに静止状態への移行の失敗など、いくつかの特徴的な機能を伴って顕在化し、抗原非依存性のメモリーT細胞恒常性応答を獲得する。T細胞の疲弊は、マウスにおける慢性ウイルス感染において最初に記述されたが、それは、HIVおよびC型肝炎ウイルス（HCV）などの感染中のヒトにおいて、ならびに癌においても観察されている。重要なことに、T細胞の疲弊は感染症および腫瘍の最適な制御を妨げるが、たとえばプログラムされた細胞死タンパク質1（PD1）および細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA4）を標的とすることにより、疲弊において過剰発現される経路を調節することにより、この機能不全の状態を逆転させ、免疫応答を再活化（reinvigorate）することができることである。しかしながら、これらの免疫応答は患者においてまれにしか耐久性がない。特定の実施形態では、患者は疾患を有し、本開示の操作されたT細胞で処置される。特定の実施形態では、T細胞は、たとえば、CRISPR/Cas9ターゲティングを介して、上記のように操作される。特定の実施形態では、T細胞は、T細胞におけるエピジェネティックな変化をもたらす薬物への曝露によって操作される。特定の実施形態では、T細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように操作される。特定の実施形態では、疾患は癌である。特定の実施形態では、疾患は感染性疾患である。

【0176】

#### 処置（治療）

特定の実施形態では、患者は、本開示の操作されたT細胞を投与される。ここで、そのT細胞は、T細胞の疲弊を防止、逆転または増加させるように操作されている。さらなる実施形態において、患者は、T細胞の疲弊を防止または逆行するように操作されている、本開示の操作されたT細胞を投与される。特定の実施形態では、T細胞は、本明細書に記載されるように、T細胞における高優先度エピジェネティック経路を標的とすることによって操作されている。特定の実施形態では、操作されたT細胞の投与は、患者における免疫学的応答を増加させる。特定の実施形態では、疾患を有する患者は、操作されたT細胞が投与される前に、1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤で疾患について治療される。特定の実施形態では、操作されたT細胞を投与する前に、患者は、1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤で処置される。特定の実施形態では、操作されたT細胞は、免疫チェックポイント阻害剤と同時にまたは同時発生的に投与される。免疫チェックポイント阻害剤は、これらに限らないが、PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM3、B7-H3、BTLA、VISTA、CD40、CEACAM1/CD66a、CD80/B7-1、CD86/B7-2、OX40/CD134、CD40 Ligand、ICOS Ligand/B7-H2、4-1BBL/CD137L、またはB7-DC/PD-L2/CD273のアンタゴニストまたはそれらに対する抗体であり得る。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗免疫チェックポイント阻害剤抗体で標的化される。特定の実施形態では、抗免疫チェックポイント阻害剤抗体は、抗-PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM3、B7-H3、BTLA、VISTA、CD40、CEACAM1/CD66a、CD80/B7-1、CD86/B7-2、OX40/CD134、CD40 Ligand、ICOS Ligand/B7-H2、4-1BBL/CD137L、B7-DC/PD-L2/CD273、CD39/CD73、CD200/CD200R、LAG-3、TNFR2、KIRs、IDO、IL-10、IL-27、またはTIGIT/CD226/CD112/CD122R/CD94抗体である。特定の実施形態では、患者は、本開示の抗免疫チェックポイント阻害剤および操作されたT細胞で同時にまたは同時発生的に処置される。

【0177】

10

20

30

40

50

### ヒト化抗体

特定の実施形態では、非ヒト抗体はヒト化することができる。ここで、抗体の特定の配列または領域は、ヒトにおいて自然に産生される抗体との類似性を高めるように改変される。たとえば、本発明において、抗体またはその断片は、非ヒト哺乳動物scFvを含み得る。一実施形態では、抗原結合ドメイン部分はヒト化されている。

#### 【0178】

ヒト化抗体は、これらに限らないが、以下を含む、当技術分野において既知の様々な技術を用いて生産することができる：CDR移植（たとえば、それぞれ全体が引用により本明細書に組み込まれる、欧州特許第239,400号、国際公開第WO 91/09967号、ならびに米国特許第5,225,539、5,530,101、および5,585,089号を参照）、ベニアリング（veneeding）またはリサーフェシング（たとえば、それぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、欧州特許第EP 592,106およびEP 519,596号、Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; およびRoguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973を参照）、チェーンシャッフリング（たとえば、全体が引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,565,332号を参照）、ならびに、たとえば、それぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第US2005/0042664号、米国特許出願公開第US2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開第WO 9317105号、Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas et al., Protein Eng., 13 (5): 353-60 (2000)、Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16): 10678-84 (1997)、Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp): 5973s-5977s (1995)、Couto et al., Cancer Res., 55(8): 1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)、およびPedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)に開示される技術。しばしば、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換され、抗原結合を変更、好ましくは改善する。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法により、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに、特定の位置での普通でないフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される（たとえば、それぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、Queen et al., 米国特許第5,585,089号、およびRiechmann et al., 1988, Nature, 332:323を参照）。

#### 【0179】

ヒト化抗体は、非ヒトであるソースからそれに導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「インポート」残基としばしば呼ばれ、それは、典型的には、「インポート」可変ドメインから取得される。したがって、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つまたは複数のCDRおよびヒト由来のフレームワーク領域を含む。抗体のヒト化は当技術分野で周知であり、ヒト抗体の対応する配列の代わりにげっ歯類のCDRまたはCDR配列を置換することにより、すなわちCDR移植（それぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、欧州特許第239,400号、国際公開第WO 91/09967号、および米国特許第4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640号）により、Winter および共同研究者（Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)）の方法にしたがって、本質的に行うことができる。そのようなヒト化キメラ抗体では、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ないものが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのフレームワーク（FR）残基がげっ歯類抗体における類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。抗体のヒト化は、ベニアリングまたはリサーフェシング（欧州特許第592,106号; 欧州特許第519,596号; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):4

89-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); および Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994))またはチェーンシャッフリング (米国特許第 5,565,332号) によっても達成することができる。これらそれぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる。

#### 【0180】

ヒト化抗体を作製する際に用いられるヒト可変ドメイン、軽鎖および重鎖の両方の選択は、抗原性を低下させることである。いわゆる「ベストフィット」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全体のライブラリーに対してスクリーニングされる。げっ歯類の配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク (FR) として受け入れられる (それぞれ内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる (内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993))。

10

#### 【0181】

抗体は、標的抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持しながらヒト化することができる。本発明の一態様によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いて、親配列および様々な概念的ヒト化産物を分析するプロセスによって調製される。

20

#### 【0182】

三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な三次元立体構造を例示および表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性ある役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンが標的抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基を選択し、レシピエント配列およびインポート配列から組み合わせ、標的抗原に対する親和性の増大などの所望の抗体特性を達成することができる。一般に、CDR残基は、抗原結合への影響に直接かつ最も実質的に関与する。

30

#### 【0183】

ヒト化抗体は、オリジナルの抗体と同様の抗原特異性を保持する。しかしながら、ヒト化の特定の方法を用いて、標的抗原への抗体の結合の親和性および/または特異性は、内容の全体が引用により本明細書に組み込まれる、Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999)に記載されるように、「定向進化 (directed evolution)」の方法を用いて増加させることができる。

#### 【0184】

#### T細胞

急性感染またはワクチン接種の間に、ナイーブT細胞は活性化され、1~2週間にわたってエフェクターT細胞に分化する。この分化は、強力な増殖、転写、エピジェネティックおよび代謝的再プログラミング、ならびにエフェクター機能、変化した組織ホーミング、および劇的な数値的拡大などのエフェクターT細胞の基本的な特徴の獲得を伴う。エフェクターの拡大のピーク、炎症の解消、および抗原のクリアランスに続いて、ほとんどの活性化T細胞は死ぬが、サブセットは存続し、メモリーT細胞プールに移行する。これらのメモリーT細胞は、エフェクターT細胞の活性化プログラムの多くをダウンレギュレートするが、それらは、再刺激時にエフェクター機能を迅速に再活性化する能力を維持する。さらに、メモリーT細胞は、抗原非依存性の自己再生の重要なメモリー特性を発達させる。これは、インターロイキン-7 (IL-7) とIL-15によって駆動される幹細胞のような遅い分裂の一種である。急性感染またはワクチン接種後のメモリーT細胞サブセットおよび分化には、かなりの多様性および複雑性がある (たとえば、エフェクターメモリーT細胞と中央

40

50

メモリーT細胞)。しかしながら、機能的で持続的なメモリーT細胞の発達の重要な側面は、エフェクターフェーズの後、メモリー発達が、進行中の抗原刺激および高レベルの持続的な炎症がない状態で発生することである(Wherry and Kurachi. Nat Rev Immunol. 2015, 15(8):486-499)。

#### 【0185】

対照的に、慢性的な感染症や癌 - 持続的な抗原曝露および/または炎症を伴う - の間に、このメモリーT細胞分化のプログラムは著しく変化する。T細胞の疲弊と呼ばれる変化した分化状態は、通常、エフェクター機能の進行性および階層的喪失、複数の抑制性受容体の持続的なアップレギュレーションおよび共発現、主要な転写因子の変化した発現および使用、代謝攪乱、ならびに静止状態への移行および抗原非依存性メモリーT細胞恒常性応答の獲得の失敗など、いくつかの特徴的な特徴を示す。T細胞の疲弊は、マウスにおいて慢性ウイルス感染において最初に記述されたが、HIVやC型肝炎ウイルス(HCV)などの感染中のヒト、および癌においても観察されている。重要なことに、T細胞疲弊は感染症および腫瘍の最適な制御を妨げるが、たとえばプログラムされた細胞死タンパク質1(PD1)および細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA4)を標的とすることにより、疲弊において過剰発現された経路を調節することは、この機能不全の状態を逆転させ、免疫反応を再活化することができる。しかしながら、T<sub>EX</sub>を完全には再活化できないため、耐久性のある臨床応答はしばしば発生しない。

#### 【0186】

##### 疲弊T細胞

疲弊したT細胞は不活性ではない。それらは、進行中の病原体の複製または腫瘍の進行を制限する、最適ではないが重要な機能を保持する。疲弊したT細胞によって媒介されるこの宿主 - 病原体の膠着状態にもかかわらず、これらの細胞は病原体または腫瘍を根絶するのに効果的ではなく、疲弊を回避または逆転することに大きな関心が寄せられている。T細胞の疲弊が終末期または不可逆的な運命ではなく(少なくとも集団レベルで)可逆的であることの実証は、免疫療法を用いて免疫を改善する実質的な臨床機会を供する。これらのヒト治療の免疫学的効果は完全に規定されていないが、新たな結果は、ヒトにおけるT細胞疲弊の逆転が、PD1経路を遮断する剤を受容している多くの患者に見られる顕著な抗腫瘍効果の原因となるメカニズムであるという考えを支持する。

#### 【0187】

疲弊した免疫細胞は、同じタイプの対応する対照免疫細胞と比較して、細胞毒性活性、サイトカイン産生、増殖、輸送、食作用活性、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%またはそれを超える減少を有し得る。一実施形態では、疲弊した細胞は、CD8+ T細胞(たとえば、抗原特異的であるエフェクターCD8+ T細胞)である。CD8細胞は、通常、T細胞受容体および/または共刺激受容体刺激に応答して、ならびにIL-2などのサイトカインに応答して、増殖(たとえば、クローン的に拡大)する。したがって、疲弊したCD8 T細胞は、正常な入力シグナルに応答して増殖および/またはサイトカインを産生しないものである。エフェクター機能の疲弊は、いくつかの段階に従って描写され、結局は、終末的または完全な疲弊、そして最終的には削除につながるということが知られている(Yi et al. (2010) Immunol. 129:474-481; Wherry and Ahmed (2004) J. Virol. 78:5535-5545)。最初の段階で、機能的なT細胞は、IL-2産生の喪失、TNF 産生の減少、増殖および/またはエクスピボ溶解の能力の低下を含む、エフェクター機能のサブセットの喪失を特徴とする「部分的疲弊I」期に入る。第2段階では、IL-2とTNF との両方の産生が抗原刺激後に停止し、IFN 産生が低下すると、部分的に疲弊したT細胞が「部分的疲弊II」期に入る。「完全疲弊」または「終末疲弊」は、CD8+ T細胞が、IL-2、TNF 、およびIFN の産生の欠如、ならびに抗原刺激後のエクスピボ溶解能および増殖能の喪失を含む、すべてのエフェクター機能を失うときに発生する。完全に疲弊したCD8+ T細胞は、正常な入力シグナルに対する応答において、増殖せず、標的細胞を溶解せず(細胞毒性)、および/またはIL-2、

TNF、IFN などの適切なサイトカインを産生しないものである。このようなエフェクター機能の欠如は、抗原の負荷が高い場合、および/またはCD4の助けが低い場合に発生し得る。この階層的な機能の喪失は、PD-1、TIM-3、LAG-3などの共阻害剤免疫受容体の発現にも関連している (Day et al. (2006) Nature 443:350-4; Trautmann et al. (2006) Nat. Med. 12:1198-202; および Urbani et al. (2006) J. Virol. 80:1398-1403)。他の分子マーカーは、終末的に疲弊したT細胞のマーカーとしての高エオメソデルミン (eomesodermin) (EOMES) および低TBET発現など、免疫細胞疲弊の階層的な段階を区別する (Paley et al. (2012) Science 338:1220-1225)。Bcl-bの減少およびBLIMP-1 (Prdm1) の生産の増加など、疲弊T細胞の追加マーカー。

#### 【0188】

特定の実施形態では、疲弊したCD8 + T細胞は、チェックポイント阻害剤、PD-1 (Pdc d1)、TIM-3 (Havcr2)、LAG-3 (Lag3)、CTLA-4 (Ctla4)、2B4 (CD244)、CD39 (Entpd1)、CD160、エオメソデルミン (eomesodermin) (Eomes)、T-BET (Tbx21)、BATF、BLIMP-1 (Prdm1)、NFATC1、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、Foxp1、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるT細胞疲弊バイオマーカーを発現する。さらに別の実施形態では、T細胞はCD8+ T細胞である。さらに別の実施形態では、CD8+ T細胞は、非疲弊T細胞または疲弊T細胞である。別の実施形態では、非疲弊CD8+ T細胞は、ナイーブ、機能的エフェクター、またはメモリー細胞である。別の実施形態では、疲弊CD8+ T細胞は、チェックポイント阻害剤、PD-1 (Pdc d1)、TIM-3 (Havcr2)、LAG-3 (Lag3)、CTLA-4 (Ctla4)、2B4 (CD244)、CD39 (Entpd1)、CD160、エオメソデルミン (Eomes)、T-BET (Tbx21)、BATF、BLIMP-1 (Prdm1)、NFATC1、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、Foxp1、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるT細胞疲弊バイオマーカーを発現する。さらに別の実施形態では、T細胞は、哺乳動物から単離され、操作され、そしてエキスピボで哺乳動物に戻される、初代T細胞である。さらに別の実施形態では、T細胞は、哺乳動物内でインピボで存在するか、またはインピトロで培養される。

#### 【0189】

##### 抑制性受容体および免疫チェックポイント遮断による処置

抑制性受容体は、自己反応性および免疫病理学を制御する重要な負の調節経路である。抑制性受容体は、活性化中に機能的エフェクターT細胞において一時的に発現されるが、抑制性受容体のより高く持続的な発現は、疲弊T細胞の特徴である。PD1リガンド1 (PDL1) および/またはPDL2の結合にตอบสนองしてPD1によって媒介される抑制性シグナル伝達経路は、例示的な例を提供する。抑制性受容体PD1がT細胞疲弊を制御する分子メカニズムについての我々の理解は不完全であり、理論に縛られることを望まないが、PD1などの抑制性受容体がT細胞機能を調節するメカニズムはいくつかある：最初に、外部ドメイン競合によるもの。これは、標的受容体またはリガンドを隔離する、および/またはマイクロクラスターおよび脂質ラフト (たとえば、CTLA4) の最適な形成を防止する阻害性受容体を指す；第2に、細胞内メディエーターの調節を介するもの。これは、TCRおよび共刺激受容体などの活性化受容体からの陽性シグナルの局所的および一過性の細胞内減衰を引き起こし得る；ならびに、第3に、抑制遺伝子の誘導を介するもの。

#### 【0190】

PD1について特定の知見はあるが、PD1を含む、抑制性受容体の作用の細胞内メカニズムの理解は不完全である。PD1の細胞内ドメインは、免疫受容体チロシンベースの抑制性モチーフ (ITIM) および免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ (ITSM) 35を含む。インピトロの研究は、チロシンタンパク質ホスファターゼSHP1 (別名PTPN6) および/またはSHP2 (別名PTPN11) のリクルーティングにおけるITSMの役割を示唆する。PD1機能におけるITIMの役割はほとんど理解されていない。他の証拠は、ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K)、AKTおよびRAS経路の調節におけるPD1シグナル伝達の役割を示唆し、PD1を細胞周期制御に関連付ける。特に、PD1がT細胞シグナル伝達を制御する方

10

20

30

40

50

法に関する我々の情報の多くは、急性的に活性化されたT細胞のインビトロの研究に由来する。急性T細胞の活性化および拡大の間のPD1の役割のインビボでの研究は、状況に応じて、移動性停滞の増加または遊走停止の減少のいずれかにおけるPD1シグナル伝達についての可能性ある役割を示唆する。最後に、PD1の下流のシグナル伝達は、アクティベータープロテイン1 (AP-1) ファミリーメンバーベシククロイシンジッパー転写因子ATF様をコードするBATFなどのエフェクター遺伝子の発現を負に調節し得る遺伝子の発現を実際に誘導し得る。このエレガントな研究にもかかわらず、これらの観察がインビボで慢性感染症に曝された疲弊したT細胞にいかに関連するかは不明である。

#### 【0191】

PD1の発現は、T細胞活性化により急速にアップレギュレートされ、健康なヒトでは中程度のレベルで持続し得る。これは、PD1の発現だけでは疲弊T細胞のユニークな特徴ではないことを示している。しかしながら、慢性感染中、PD1の発現は、機能性エフェクターまたはメモリーCD8+ T細胞で観察されるよりも実質的に高くなり得る。慢性感染の間、PD1の持続的なアップレギュレーションは、通常、継続するエピトープ認識に依存する。ただし、持続する抗原シグナル伝達を取り除いた後でさえ、PD1の残存発現の例が存在する。

10

#### 【0192】

PD1に加えて、疲弊したT細胞は他のさまざまな細胞表面抑制分子を発現する。疲弊したT細胞は、リンパ球活性化遺伝子3タンパク質 (LAG3)、2B4 (別名CD244)、CD160、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン含有タンパク質3 (TIM3、別名HAVCR2)、CTLA4および多くの他の抑制性受容体と共にPD1を共発現することができる。典型的には、疲弊T細胞によって共発現される阻害性受容体の数が多いほど、疲弊はより深刻になる。実際、PD1または他の抑制性受容体の個々の発現は疲弊を示すものではないが、複数の抑制性受容体の同時発現は重要な特徴である。複数の抑制性受容体を同時に遮断すると、T細胞疲弊が相乗的に逆転するため、これらの共発現パターンは機能的に関連している。この概念は、慢性LCMV感染におけるPD1およびLAG3について、ならびに、HIV感染、その他の感染症および癌におけるPD1およびCTLA4について実証された。PD1およびTIM3などの抑制性受容体の他の多くの組み合わせも、疲弊T細胞を同時調節できる。黒色腫の患者におけるPD1およびCTLA4の遮断は、印象的な腫瘍制御を示し、阻害性受容体を遮断する他の剤の組み合わせの臨床試験が進行中である (たとえば、PD1経路

20

30

#### 【0193】

抑制性受容体に加えて、共刺激受容体がT細胞疲弊に関与していることが明らかになっている。たとえば、アダプター分子の喪失を介した共刺激経路シグナル伝達の脱感作は、慢性感染中のT細胞機能不全のメカニズムとして機能し得る。シグナリングアダプター腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) 関連因子1 (TRAF1) は、HIV進行因子の機能不全T細胞において、および慢性LCMV感染において、ダウンレギュレートされる。TRAF1を発現するCD8+ T細胞の養子移入は、TRAF1欠損CD8+ T細胞の移入と比較して、慢性LCMV感染の制御を増強し、このことは、この設定におけるTRAF1依存性共刺激経路のための重要な役割を示している。正の共刺激経路に対するアゴニスト抗体を阻害経路の遮断と組み合わせることにより疲弊を逆転するための共刺激の潜在的な有益な役割を活用することも可能になった。4-1BB (CD137およびTNFRSF9としても知られている) は、TNFRファミリーメンバーであり、活性化T細胞で発現される正の共刺激分子である。PD1遮断と4-1BBに対するアゴニスト抗体での処置とを組み合わせることにより、疲弊したT細胞機能およびウイルス制御は劇的に改善された。T細胞疲弊の間の正対負の共刺激の単純なモデルは、

40

50



おそらくメカニズムの妥当性を有するが、経路の多様性および実験データの多くは、特定の定性的なシグナルが異なる共刺激経路および共抑制経路によって与えられ得ることを示唆する (Wherry and Kurachi. Nat Rev Immunol. 2015, 15 (8) : 486-499)。

【0194】

特定の実施形態では、阻害性受容体が患者において標的とされる。特定の実施形態では、阻害性受容体は、免疫チェックポイント阻害剤で標的化される。免疫チェックポイント阻害剤は、これらに限らないが、PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM3、B7-H3、BTLA、VISTA、CD40、CEACAM1/CD66a、CD80/B7-1、CD86/B7-2、OX40/CD134、CD40リガンド、ICOS リガンド/B7-H2、4-1BBL/CD137L、または B7-DC/PD-L2/CD273のアゴニストであり得る。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤に対する1つまたは複数の抗体で標的化される。免疫チェックポイント阻害剤は、これらに限らないが、抗-PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM3、B7-H3、BTLA、VISTA、CD40、CEACAM1/CD66a、CD80/B7-1、CD86/B7-2、OX40/CD134、CD40リガンド、ICOS リガンド/B7-H2、4-1BBL/CD137L、または B7-DC/PD-L2/CD273抗体であり得る。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗免疫チェックポイント阻害剤抗体で標的化される。特定の実施形態では、患者は、本開示の抗免疫チェックポイント阻害剤および操作されたT細胞で同時にまたは同時発生的に治療される。特定の実施形態では、患者は、たとえば、免疫チェックポイント阻害剤による処置後、1分、5分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、または7日に、患者が抗免疫チェックポイント阻害剤で処置されている後に本開示の操作されたT細胞で処置される。

【実施例】

【0195】

実験例

以下の実験例を参照することにより、本発明をさらに詳細に説明する。これらの例は、説明のみを目的として提供されており、特に指定のない限り、制限することを意図したものではない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書に提供される教示の結果として明らかになる任意のすべての変形を包含すると解釈されるべきである。

【0196】

さらに説明することなく、当業者は、先の説明および以下の例示的な実施例を用いて、本発明のアッセイを作成および利用し、請求される方法を実施することができると考えられる。したがって、以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を具体的に指摘しており、本開示の残りの部分を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

【0197】

これらの実験で用いられた材料および方法を次に説明する。

【0198】

マウス、感染症、および抗体処置

5~6週齢のメスのC57BL/6およびB6-Ly5.2CR (Ly5.1を発現するB6マウス) は、Charles River (NCI strains) から購入した。C57BL/6 P14マウスをB6-Ly5.2CRマウスと交配して、記載されるようにP14 Ly5.1<sup>+</sup>マウスを生成した (Odorizzi et al. J. Exp. Med. 2015, 212 : 1125-1137)。LCMV株 (Armstrong (Arm) およびクローン13) を増殖させ、記載されるとおりに力価を測定した (Odorizzi et al. J. Exp. Med. 2015, 212 : 1125-1137)。B6マウスに腹腔内 (i.p.) に $2 \times 10^5$  PFU LCMV Armを、または静脈内 (i.v.) に $4 \times 10^6$  PFU LCMVクローン13を感染させ、それぞれ急性感染または持続感染を確立した。すべてのクローン13感染について、CD4 T細胞を、LCMVクローン13で、<sup>-1</sup>および<sup>+1</sup> 日p.i.に、200  $\mu$ gの抗CD4 (クローンGK1.5、Bio X Cell) をi.p.注入することにより枯渇させた。抗PD-L1 (クローン10F.9G2、Bio X Cell) またはアイソ

タイプ対照抗体 (Rat IgG2b、Bio X Cell) を、記載されるように、22 ~ 25 日 p.i. の間に開始し、3 日ごとに5回の注射の200 µg/注射を5回の合計処置で、i.p. 投与した (Barber et al. Nature 2006, 439, 682-687)。いくつかの実験では、対照としてピヒクル (PBS) を注射した。IL-7をインビボで投与した実験では、サイトカインは抗IL-7と複合体化させて安定性を高めた。これらの実験のために、IL-7/抗IL-7免疫複合体 (i.c.) を記載されるように調製した (Boyman et al. J. Immunol. 2008, 180 : 7265-7275)。簡単に言うと、注射あたりマウス1匹あたり1.5 µgの組換えヒトIL-7 (NCI Preclinical RepositoryまたはBiolegend) および7.5 µgの抗ヒト / 抗マウスIL-7 (Charlie Surh提供のクローンm25) を混合し、30分間、複合体化させ、その後、注射用PBSで希釈した。複合体は抗PD-L1と同時にi.p. 投与した (5回の注射で3日ごと)。すべてのマウスはUniversity of Pennsylvaniaで特定の無菌条件下で維持し、すべてのプロトコルはInstitutional Animal Care and Use Committeeによって承認された。

【 0 1 9 9 】

#### リンパ球単離および養子移入

P14細胞を監視する実験では、P14トランスジェニックマウスの末梢血からヒストパクグラジエント (histopaque gradients) を用いてP14細胞を単離し、P14細胞 (クローン13実験では500、Arm実験では500 ~ 2000) を感染の少なくとも1日前に5 ~ 6週齢のレシピエントB6マウスにi.v. で養子移入した。P14細胞を内因性D<sup>b</sup>GP33<sup>+</sup>およびD<sup>b</sup>GP276<sup>+</sup>細胞と比較した場合に同様の結果が得られ (図5)、以前の報告では、クローン13実験のために移入されたP14細胞の数 (500) がウイルスロードに影響を与えなかったことを示している (Odorizzi et al. J. Exp. Med. 2015, 212:1125-1137; Blattman et al. J. Virol. 2009, 83:4386-4394)。T<sub>MEM</sub>、T<sub>EX</sub>、または抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>を養子移入した実験では、CD8 T細胞は、抗体処理期間の1日後に脾臓から単離し、製造元の指示にしたがってCD8 T細胞EasySep陰性選択キット (Stem Cell Technologies) を用いて富化した。番号は、抗原のないレシピエントマウスへのi.v. 養子移入前のD<sup>b</sup>GP33テトラマー染色に基づいてグループ間で正規化した。LCMV免疫マウス (30<sup>+</sup>日 p.i.) を抗原のないレシピエントとして用いたため、内因性LCMV特異的メモリーは、記載されるように任意の移入されたウイルスを排除することができた (Angelosanto et al. J. Virol. 2012, 86 : 8161-8170)。抗原非依存的持続性をテストする実験では、レシピエントマウスはLCMV Armに免疫性であった (30<sup>+</sup>日 pi)。再チャレンジ実験では、レシピエントマウスは、記載されるようにGP33エピトープを欠如するLCMVクローン13 V35Aによる低用量 (200 PFU) 感染を以前に解消していた (Shin, et al. J. Exp. Med. 2007, 204 : 941-949)。V35A免疫マウスは、内因性D<sup>b</sup>GP33特異的メモリーCD8 T細胞との直接の競合を防ぐためにリコール実験に用いた。

【 0 2 0 0 】

#### フローサイトメトリー

MHCクラスIペプチド四量体 (D<sup>b</sup>GP276およびD<sup>b</sup>GP33) は、記載されるように (Qiu et al. Nat. Biotechnol. 2011, 29 : 886-891) 作成するか、またはNIH四量体コアから取得した。抗体は、eBioscience、BD、Biolegend、Life Technologies、R&D Systems および AbD Serotecから購入し、CD8、CD4、B220、CD45.1、CD45.2、CD44、CD122、CD127、PD-1、2B4、Tim-3、Lag-3、Ki-67、granzyme B、IFN、TNF、および phospho-STAT5に対する抗体が含まれる。単一細胞懸濁液は、製造元の指示に従ってLive/Dead Aqua (Life Technologies) で染色した後、表面抗原について染色した。Ki-67およびグランザイムBについての細胞内染色は、製造元の指示 (eBioscience) にしたがってeBioscience Foxp3固定化 / 透過化キットを用いて行った。プレフェルジンAおよびモネンシン (BD) の存在下で0.2 µg/mlのgp33-41ペプチド (KAVYNFA<sup>TM</sup>、GenScript) を用いて5時間のインビトロでの再刺激を行った後、製造元の指示 (BD) にしたがって、BDサイトフィックス / サイトパームキットを用いて、IFN および TNF の細胞内染色を行った。phosho-STAT5検出では、刺激の前に脾細胞を37 °Cで1 ~ 2時間、休ませた。細胞を10 ng/mlの組換えマウスIL-7またはIL-15 (Peprotech) で30

分間刺激した。次に、細胞を37℃で15分間、パラホルムアルデヒドで固定し、1回洗浄し、直ちにPhospho Perm Buffer III (BD) に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、製造元の指示に従って染色した。細胞をLSR IIフローサイトメーター (BD) で収集し、FlowJoソフトウェア (Tree Star) を用いてデータを分析した。ソーティングはFACS Aria (BD) で行い、ソートのクオリティーを決定するために、ソート後の純度を得た。

#### 【0201】

##### マイクロアレイおよびRNA-seqによる遺伝子発現

マイクロアレイによる転写プロファイリングのために、最終的な処置の1～2日後の脾臓からのCD8 T細胞 (上記のように合計5回の処置を受けた後) を、磁気ビーズ (CD8陰性選択キット、Stem Cell Technologies) を用いて富化し、D<sup>b</sup>GP276<sup>+</sup> CD8 T細胞をFACS Aria (BD) でソートした。実験ごとにグループごとにプールした10～12匹のマウスで、各処置グループに対して4つの独立した実験を行った。RNAは、製造元の指示に従ってTRIzol (Life Technologies) で単離した。RNAをプロセッシングし、増幅し、ラベルを付け、University of Pennsylvania Microarray FacilityのAffymetrix GeneChip M<sub>o</sub>Gene 2.0 STマイクロアレイにハイブリダイズさせた。マイクロアレイデータは、以前に記載されるように処理および分析した (Doering et al. Immunity 2012, 37: 1130-1144)。Gene Patternのヒートマップモジュールを、異なって発現された遺伝子を同定して表示するために用いた。遺伝子セット富化分析およびリーディングエッジのメタ遺伝子分析は、記載されるように行った (Godec et al. Immunity 2016, 44: 194-206)。抗PD-L1のためのメタジーンを、抗PD-L1を対照T<sub>EX</sub>と比較するマイクロアレイデータセットを用いて同定した。T<sub>EFF</sub> (LCMV Arm感染後8日目)、T<sub>MEM</sub> (LCMV Arm感染後30日目)、およびT<sub>EX</sub> (LCMVクローン13感染後30日目) 細胞のメタジーンは、以前に公開された転写プロファイルを用いてナイーブT細胞と比較することによって生成した (Doering et al. Immunity 2012, 37: 1130-1144)。メタ遺伝子の組成と比較の詳細は、Pauken et al. Table S4 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) に見出される。図2Cに示すエフェクター遺伝子リストを作成するために、我々は、(Doering et al. Immunity 2012, 37: 1130-1144) におけるナイーブと比較した6日後Armで上方制御されたトップ300の遺伝子で開始した。次に、6つの主要な細胞周期ターム (細胞周期、有糸分裂、紡錘体、DNA複製、有糸分裂細胞周期、および細胞周期) でGOメンバーシップを有する遺伝子が削除した。このリストは、Pauken et al. Table S3 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165) に示される。

#### 【0202】

RNA-seqによる転写プロファイリングのため、脾臓からのCD8 T細胞を磁気ビーズ (CD8ネガティブセレクションキット、Stem Cell Technologies) を用いて富化し、P14細胞をFACS Aria (BD) でソートした。P14細胞を、最終処理の1日後 (上記のように5用量の抗PD-L1または対照を使用; 対照について3つの独立した実験 (それぞれ5～7マウスをプール)、抗PD-L1について4つの独立した実験 (それぞれプールされた5～6匹のマウス))、または最終処理後の長期 (2つの独立した実験、18 (プールされた対照処理マウス5匹および抗PD-L1処理マウス7匹) および29週間 (プールされた対照処理マウス13匹および抗PD-L1処理マウス12匹)) でソートした。ナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞を、2つの独立した実験からの2～3匹の非感染C57BL/6マウスからのプールされた脾臓からソートした。細胞を溶解し、1%の2-メルカプトエタノール (Sigma) を含む緩衝液RLT plus (RNeasy Plus Lysis Buffer、Qiagen) 中で凍結した。ソートされた細胞からのトータルのRNAは、Applied Biosystems Arcturus PicoPure RNA単離キットを用いて抽出した。Clontech SMRT-seq v4法を用いて二本鎖cDNAを生成し、マイクロチューブ中にCovaris S220を用いて断片化した。インデックス付きのイルミナ互換 (Indexed Illumina-compatible) シーケンシングライブラリーを、NEBNext Ultra II法を用いて断片化されたcDNAから生成した。ライブラリーは、Illumina用のKapa Library QCキットを用いて定量化し、プールし、Illumina NextSeq 500で75サイクル (シングルエンド) シーケンスした

。配列決定されたライブラリーをSTARを用いてmm10リファレンスゲノムにアラインし、RefSeq遺伝子からの遺伝子発現をCufflinksを用いて定量化し、FPKM値として報告した。

#### 【0203】

##### ATAC-seqによるエピジェネティックプロファイリング

CD8 T細胞は、磁気ビーズ（CD8ネガティブ選択キット、Stem Cell Technologies）を用いて富化し、P14 CD8 T細胞（8日pi Arm（プールした実験あたり5の脾臓）、33日pi Arm（プールした実験あたり12～13の脾臓）、35日piクローン13（コントロール処理プールの実験で15の脾臓、抗PD-L1処理プールの実験で7匹のマウス））またはナイーブCD8 T細胞（プールした2～3の脾臓から）をFACSAria（BD）でソーターした。対照および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>細胞を、上記のように、最終処理（合計5処理、3日ごと）の1日後にソーターした。条件ごとに2つの独立した実験を行った。ATAC-seqは、Buenrostro et al. Nat. Methods 2013, 10:1213-1218に記載されるように行った。簡単に言えば、核を、10 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、および0.1% IGEPAL CA-630の溶液を用いて、複製ごとに50,000～150,000のソーターされた細胞から単離した。核単離の直後に、転移反応を、Tn5トランスポザーゼおよびTDバッファー（Illumina）を用いて37℃で45分間、行った。転移されたDNA断片は、Qiagen MinElute Kitを用いて精製し、デュアルインデックスでバーコード化し（Illumina Nextera）、そしてNEBNext High Fidelity 2x PCRマスターミックス（New England Labs）を用いてPCR増幅した。シーケンシングライブラリのサイズ分布およびモル濃度は、Agilent BioanalyzerおよびKAPA定量RT-PCR（KAPA Biosystems）を用いることにより決定した。シーケンシングは、NextSeq 500（Illumina）でV2 chemistryを備えた高出力150サイクルキットを用いて行った。ペアエンドリードは、Bowtie2を用いてmm10リファレンスゲノムにマッピングした。一致してマッピングされたペアのみを、さらなる分析のために保持した。MACS v1.4を用いてピークコーリングを行い、シーケンスタグ富化の領域を同定した。BedToolsを用いて、同定されたピーク間の共通の交差点を見出し（1bp最小オーバーラップ）、マージされたピークリストを作成した。ATAC-seqタグ濃縮、マージされたピークリスト全体のDNAモチーフ分析、およびGOターム評価を、HOMER（homer.salk.edu）を用いて計算した。主成分分析、スペクトル共クラスタリング、および階層的クラスタリングを、scipy、matplotlib、およびscikit-learnを用いて行った。REVIGOは、異なる細胞型にまたがるユニークなGOタームを同定するために用いた。ピークのリストをいくつかのダウンストリーム分析用にフィルタリングして、全部で5つの細胞型にわたって富化が低いピークを削除した（第3四分位）。

#### 【0204】

##### 転写因子フットプリントおよびネットワーク分析

T<sub>EX</sub>のユニークなエピジェネティックな景観に基づく統合された転写ネットワークを構築するために（図19D）、ウェリントンブートストラップ（Piper et al. BMC Genomics 2015, 16:1000）を最初に用いて、5つの細胞型（T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>、T<sub>MEM</sub>、T<sub>EX</sub>、抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>）のすべての順序付けられたペアについて20セットの差分フットプリントを計算することにより精査された他の細胞型と比較したすべてのOCRにおける対照または抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>のいずれかにおいて富化された転写因子（TF）結合モチーフを同定した。差分フットプリントにおけるモチーフ頻度を分析するために、HOMERからのannotatePeaks.plスクリプトを用いてこれらのフットプリント座標内でモチーフ検索を行い（Heinz et al. Mol. Cell 2010, 38:576-589）、相対モチーフ頻度を（Piper et al. BMC Genomics 2015, 16:1000）に記載されるように計算した。マトリックスを生成し、GenePatternのClassNeighborsモジュール（Reich et al. Nat. Genet. 2006, 38:500-501）を用いてモチーフスコアをヒートマップ（図19B）として表示して、細胞型特異的TFを示した。

#### 【0205】

有意に富化されたTF結合モチーフは、下流ネットワークに含まれることが後に確認され

た。RNA-seqにおいて転写的に検出できなかったTFおよび/またはTFフットプリント分析でのコンセンサス配列への結合の証拠が最小限であったTFは除外した。TFフットプリント検証では、異なるTFモチーフの周りの200 bpウィンドウ内のTn5カットの平均プロファイルを推定し、Wellington dnase\_average\_footprinting.py (Piper et al. Nucleic Acids Res. 2013, 41, e201) を用いてプロットした。次に、これらの検証済みのTF、およびマイクロアレイデータセットからの抗PD-L1処理後のT<sub>EX</sub>細胞において特異的に発現された遺伝子でネットワークを構築した。LFC 0.3を有する遺伝子が含まれた。TFとターゲット遺伝子を接続するラインは、その領域でそのTFのコンセンサス結合モチーフを有する遺伝子に基づいた。TFおよび標的遺伝子の完全なリストは、Pauken et al. Table S11 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)で利用可能である。

10

#### 【0206】

エピジェネティックな景観および転写の変化を関連付けるこの統合ネットワーク分析において同定されたTFを検証するために、抗PD-L1処理後にマイクロアレイから示差的に発現された遺伝子を用いて第2のネットワークを構築し(LFC 0.3アップまたはダウン、p 0.05)、PSCANを用いて、これらの遺伝子のプロモーター領域においてコンセンサス結合モチーフを含むと予測されるTFを同定した(Pauken et al. Table S12 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)で利用可能)。示差的に発現された遺伝子について各TFについての富化をヒートマップとしてプロットした(図22)。抗PD-L1がT<sub>EX</sub>においてエフェクター様回路の再関与を引き起こすという予測をテストするために、統合ネットワーク分析で同定されたTFにおけるコンセンサス結合モチーフを含むT<sub>EFF</sub>またはT<sub>EX</sub>細胞におけるすべてのOCRの近くの遺伝子を決定し(図19D)、T-bet、Eomes、Prdm1 (Blimp1)、およびRunx1-3を含む関心のある追加のTFを選択した。マイクロアレイに転写データがなかったOCRの近くの遺伝子は除外した。次に、T<sub>EFF</sub>とT<sub>EX</sub>またはT<sub>EX</sub>のみの間のオーバーラップのリストにメンバーシップを含む抗PD-L1後に変化した遺伝子のパーセンテージを計算し、T<sub>EX</sub>のみと比較したオーバーラップのパーセント差をプロットした。

20

#### 【0207】

##### 統計分析

フローサイトメトリーおよびウイルス負荷データの統計は、GraphPad Prismソフトウェアを用いて分析した。2つの条件のみを比較した場合の2つの独立した条件間の比較では、対応のないスチューデントのt検定を用いて有意性が決定された。図面の簡単な説明に示されるように、同じマウス由来の試料を2つの異なる時点で比較した場合、対応のあるスチューデントのt検定を用いた。2つを超えるグループを比較する場合、一元配置分散分析(One way ANOVA)テストを用いた。最初に、ダゴスティノとピアソンの正規性検定(D'Agostino and Pearson normality test)を用いて正規性をテストした。すべてのグループが正規分布であると判断された場合は、パラメトリック一元配置分散分析を行い、ボンフェローニの多重比較テスト(Bonferroni's multiple comparison test)を用いて、関心のあるグループのテスト後の分析を行った。すべてのグループが正規分布であると判断されなかった場合は、ノンパラメトリックANOVA(クラスカル-ウォリス検定(Kruskal-Wallis test))を行い、ダンの複数のテスト比較(Dunn's multiple test comparisons)を用いて、対象グループのテスト後の分析を行った。ANOVAのP値は各図のY軸の横に青色で示され、示されたペア間のポスト・テストのp値は黒色で示される。0.05未満の場合、P値は有意であると見なした。有意性を示すのに用いたアスタリスクは、p 0.05 \*、p 0.01 \*\*、p 0.001 \*\*\*に対応する。

30

40

#### 【0208】

##### 患者および検体収集

IV期の黒色腫の患者を、ペンの拡張アクセスプログラム(Expanded Access Program at Penn)(www.clinicaltrials.gov identifier NCT02083484)に基づいて、または、メモリアルスローンケタリングがんセンター(Memorial Sloan Kettering Cancer Center)('MSKCC')のNCT01295827に基づいて、ペンブロリズマブ(pembrolizumab

50

）での処置（3週ごとの注入により $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ）について登録した。患者は、ペンシルベニア大学アブラムソンがんセンター（University of Pennsylvania Abramson Cancer Center's）（「ペン」）の黒色腫研究プログラム組織採取プロトコルUPCC 08607に基づき、および、MSKCCのプロトコル00-144に基づいて、両機関のInstitutional Review Boardsに従って、採血について同意した。末梢血は、処置前、および各ペンブロ注入前に、3週間ごとに、12週間、ヘパリンナトリウムチューブで採取した。末梢血単核細胞（PBMC）は、フィコール勾配を用いて単離し、標準的なプロトコルを用いて保存した。

【0209】

#### 応答および腫瘍負荷の評価

腫瘍負荷：総測定可能腫瘍負荷は、治療前画像レポートで報告されたすべての測定可能な病変の長軸の合計として定義した。測定不可能な病変または活動的な脳転移のみを有する患者は、臨床応答および腫瘍負荷に関する分析から除外した。臨床応答および腫瘍負荷の評価は、盲検的に独立して行った。

10

【0210】

臨床応答、ペンコホート：Pennコホートのための抗PD-1療法に対する臨床反応は、一次元測定を用いた免疫関連RECIST（irRECIST）に基づく最良の反応として決定した（Nishino et al. Clin. Cancer Res. 2013, 19: 3936-3943）。さらに、次の変更を用いた。（1）PETスキャンでの標準取り込み値（SUV）が5を超え、短軸が10～15 mmでのリンパ節病変を測定可能な病変として含めた。（2）生検によって黒色腫と確認された5 mmを超える病変を測定可能な病変として含めた。

20

【0211】

臨床応答、MSKCCコホート：MSKCCコホートのための臨床反応は、免疫関連応答基準（Wolchok et al. Clin. Cancer Res. 2009, 15: 7412-7420）に基づいて、12週の時点での2次元測定を用いて評価した。

【0212】

#### フローサイトメトリー

ペンコホート：前処理からの凍結保存PBMC試料、サイクル1～4（3～12週）を解凍し、CD4（Biolegend、OKT4）、CD8（ebioscience、RPA-T8）、2B4（Beckman Coulter、IM2658）、CD45RA（Biolegend、HI100）、TIM-3（F38-2E2）、LAG-3（Enzo、ALX-804-806B-C100）、CXCR5-BV421（BD、RF8B2）およびCD27（BD、L128）を含む表面染色、ならびにFOXP3（BD、259D/C7）、CTLA-4（BD、BNI3）、Eomes（ebioscience、WD1928）、T-bet（Biolegend、4B10）、GzmB（Life Tech、GB11）、TCF-1-AlexaFluor647（Biolegend、7F11A10）およびKi67（BD、B56）のための細胞内染色、のための抗体のマスターミックスで染色した。透過処理は、FOXP3 Fixation / Permeabilization Concentrate and Diluent kit（eBioscience）を用いて行った。ペンブロ後の検体のPD-1は、抗ヒトIgG4 PE（Southern Biotec）を用いて検出した。前処理試料を、 $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ペンブロでインビトロで37℃で30分間、前処理し、2回洗浄して、標準的な抗体ミックスで染色した。細胞を1%パラホルムアルデヒドに再懸濁し、BD Biosciences LSR IIサイトメーターで取得し、FlowJo（Tree Star）を用いて分析した。

30

【0213】

MSKCCコホート：ペンブロリズマブ処置前および後の示されている訪問時のPBMC試料を解凍し、固定可能なAqua生存率色素（Invitrogen）および次の表面マーカーに対する抗体のカクテルで染色した：CD8-Qdot605（Invitrogen、3B5）、CD4-Qdot655（Invitrogen、S3.5）、PD-1-PE（BD、MIH4）、LAG-3-FITC（Enzo、17B4）、ICOS-PE-Cy7（eBioscience、ISA-3）、TIM-3-APC（R&D Systems、344823）。次に、細胞を固定し、FOXP3/Ki67 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent（eBioscience）で透過処理した後、CD3-BV570（Biolegend、UCHT1）、Ki67-AlexaFluor700（BD）、FOXP3-eFluor450（eBioscience）、およびCTLA-4-PerCP-eFluor710（eBioscience）で細胞内で染色した。染色された細胞をBD Biosciences LSRFortessaで取得し、FlowJoソフトウェア（FlowJo、LLC）を用いて分析した。

40

50

## 【0214】

細胞選別（ソーティング）

フローサイトメトリープロトコル（上記）のとおり、凍結保存したPBMC試料を解凍して染色した。RNAシーケンス実験では、ダンプ/デッドCD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>ゲーティングストラテジーを用いて、全CD8 T細胞を分類した。TCRシーケンス実験では、CD8 T細胞は上記のようにゲーティングし、CD38<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>およびCD38<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>でない細胞（すなわち、CD38<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>、およびCD38<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup>）をソートした。セルソーティングはBD Aria Sorterで行った。

## 【0215】

サイトカイン分析

Luminexテクノロジー（EMD Millipore）を用いて、循環血漿サイトカインの濃度を分析した。

## 【0216】

PMAおよびイオノマイシンでの刺激

解凍した細胞を、 $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ でホルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA）（Sigma）で、および $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ でイオノマイシン（Sigma）で、2～5時間、37℃で刺激し、染色した。サイトカイン産生は、IFN $\gamma$ （Biolegend、B27）およびTNF $\alpha$ （Biolegend、Mab11）に対する抗体を用いた細胞内染色で分析した。

## 【0217】

分類および回帰のためのランダムフォレスト

ランダムフォレスト回帰および分類（RF-RC）は、多変数のノンパラメトリックアンサンブルパーティショニングツリー法であり、応答変数の予測因子としての遺伝子およびタンパク質間のすべての相互作用の効果をモデル化するために用いることができる（Breiman Mach. Learn. 2001, 45 : 5-32）。各モデルは、ランダムに選択されたサンプルの約3分の2を用いて構築され、モデル構築プロセスから除外されたサンプル（「out-of-bag」サンプル）の3分の1で交差検証される。多くの反復の後、すべてのモデルの結果が平均化されて、予測値、エラーレート、および変数の重要度の測定値の不偏の推定が提供される。RF-RCモデルのパフォーマンスは、回帰の平均二乗誤差により、および分類の誤分類エラーレートにより、測定される。フローサイトメトリーのサブセットは、臨床反応変数の可能な予測因子として用いた。各予測因子について、変数のエラー率への寄与を測定する重要度スコアが決定される（スコアが高いほど予測性が高くなる）。‘randomForest’ R package version 4.6-12 implementationおよび次のパラメーター：5,000 trees, node size of 1, mtry value（すなわち、各ノードでの分割に利用できる変数の数）（モデル内の変数の数値の平方根に等しい）、ならびに重要度スコアを決定するためのブライマン・カトラー（Breiman-Cutler）順列法、を用いた。精度の平均低下は、重要度スコアの指標として用いる。

## 【0218】

マスサイトメトリーおよびCyTOF分析

マスサイトメトリー試薬は、Fluidigmから入手したか、または、MAXPARキット（Fluidigm）を用いて標識されていないmAbをアイソトープがロードされたポリマーにカスタム結合させることによって生成した。使用したマスサイトメトリー抗体を表5に示す。マスサイトメトリー染色は記載されているとおりに行った（Bengsch et al. J Immunol Methods. 2017, pii: S0022-1759（17）30132-1）。簡単に言えば、単一細胞懸濁液をペレット化し、PBS中で20  $\mu\text{M}$  ランタン-139（Trace Sciences）をロードしたマレイミド-モノ-アミン-DOTA（大環状分子）と共にインキュベートし、ライブ/デッド区別（LD）のために室温（RT）で10分間インキュベートした。細胞を染色バッファーで洗浄し、表面抗体カクテル中に再懸濁し、室温で30分間インキュベートし、染色バッファーで2回洗浄し、固定化し、FOXP3染色バッファーセット（eBioscience）を用いて透過処理し、そしてRTで60分間細胞内染色した。細胞をさらに2回洗浄した後、125 nM イリジウムを含む1.6% PFA（Electron Microscopy Sciences）溶液で4 で一晩固定した。C

10

20

30

40

50

yTOF2 (Fluidigm) でデータを取得する前に、細胞をPBSで2回、dH<sub>2</sub>Oで1回洗浄した。データ分析は、以前に概説したように (Breiman. Mach. Learn. 2001, 45: 5-32)、FlowJo v10 (TreeStar) およびSPADE (Cytobank) を用いて行った。倍率変化頻度の分析は、計算 $\log_{10}$  [合計のパーセンテージ (3週目) / (合計のパーセンテージ (前処理))] を実行するSPADEの「percenttotalratio $\log$ 」パラメーターを用いて行った。T<sub>EX</sub>、T<sub>MEM</sub>、およびT<sub>EFF</sub>細胞の要約統計を、各ノードが寄与する比率を考慮することにより、各クラスターの中央値倍率変化または質量強度 (mass intensity) として計算した。Rパッケージ「pheatmap」をヒートマップの作成に用いた。

【0219】

マスサイトメトリー (CyTOF) アッセイおよびT<sub>EX</sub>の追跡

10

(Doering et al. Immunity 2012, 37: 1130-1144) に記載されるアクセッション番号GSE41867でGene Expression Omnibus (GEO) データベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds) から入手可能な転写プロファイリングを、Pauken らおよび / または Sen ら (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165; Sen et al. Science. 2016, 354(6316):1165-1169) (GSE97646, GSE86881) に記載されるATAC-Seqデータと一緒に用いた。転写プロファイリングデータはGEOからダウンロードし、R 3.3.1およびGEOqueryパッケージを用いて注釈を付けた。ATAC-Seqオープンクロマチン領域 (OCR) 分析は、Pauken らおよび / または Sen ら (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165; Sen et al. Science. 2016, 354(6316):1165-1169) (GSE97646, GSE86881) に記載されるように行った。疲弊特異的トランスクリプトミク (transcriptomic) およびエピゲノムの発現パターンの同定は、limmaパッケージで計算されたモデレートベイズ統計を用いて行った。具体的には、モデレートT統計が対照T細胞集団と比較して ( $t = 2.9$ ) である場合、疲弊したCD8 T細胞において上方制御または下方制御された遺伝子を選択した。

20

【0220】

エピゲノム的に選択された遺伝子セットを、単一細胞プロテオミクス同定およびヒトの疲弊T細胞の評価を可能にする高パラメーターマスサイトメトリーパネル (45パラメーター) を生成するのに用いた。マスサイトメトリーデータの高次元の性質は、マスサイトメトリーパネルのパラメーターによって規定された「疲弊空間」における疲弊T細胞の活性化 / 分化状態を評価する際の実質的な分解能を許容する。tSNEベースおよびフェノグラフベースのアルゴリズムを用いるバイオインフォマティクス解析は、HIV患者、肺癌およびメラノーマ患者ならびに健常者における明確な細胞疲弊表現型を同定した。示される分析: HIVおよび癌における疾患の重症度または治療に関連する異なるT<sub>EX</sub>集団; T<sub>EX</sub>プールの組成を病状のフィンガープリントとして使用する能力; 慢性疾患 (ウイルス / 腫瘍) の患者からの健康な個体の区別を許容する、血液プロファイリングによって疲弊の個体のプールの程度を概算する能力; ならびに、機能プロファイリングのために新しく発明された疲弊スコアメトリックを用いる疲弊の表現型と機能定義との間の高い収束。具体的には、CyTOFデータのビーズベースの正規化は、www.github.com/nolanlab/bead-normalization/releasesを用いて行った。FCSファイルは、市販のソフトウェアFlowJo v10 (TreeStar)、FCSEXPRESS 6 (DeNovo Software)、ViSNE (Cytobank) によってさらに分析した。RベースのtSNE分析は、Rtsneパッケージを用いて行った。フェノグラフ分析は、(Chen et al. PLoS Comput Biol. 2016, 12(9): e1005112; Levine et al. Cell. 2015, 162(1): 184-97) に記載されるcytokitパッケージを介して実装されたR Phenographパッケージを用いて行った。視覚化のために、クラスタリング後にグラフから10000のノードをサンプリングした (すなわち、クラスタリングは完全なデータセットに対して行ったが、読みやすさのためにサブサンプルのみが表示される)。結果のサブグラフは、ForceAtlas2の強制指向レイアウトアルゴリズム (Jacomy et al. PLoS One. 2014, 9(6): e98679) を用いてレイアウトした。VisneまたはPhenographを用いる疲弊データ空間の分析は、疲弊特異的分子に対応するマスチャネルで行った。イリジウムインターカレーター陽性、一重項LD陰性CD45+ CD3+ CD8 T細胞での疲弊データスパー

30

40

50



スのフェノグラフ分析は、30個の高次元クラスターを同定し、そのうち5個（c14、c20、c22、c24、c30）は品質管理ゲーティング後にCD8 T細胞の0.01%未満の細胞頻度を示し、ダウンストリーム分析から除外した。「疲弊スコア」を開発するために、サンプルを、直接表現型分析、または、モネンシンおよびブレフェルدينAの存在下で37℃で5時間の完全培地でのPMA/イオノマイシンによる刺激のために分割し、マスサイトメトリック分析のために染色した。表現型と刺激パネルとの間で共有される疲弊特異的マーカーを、共有されるtSNEベースの疲弊マップを作成するのに用いた。フェノグラフクラスターを反映するゲートを、この共有疲弊マップにおいて同定し、刺激されたサンプルからの対応するゲートにおけるサイトカイン発現を、フェノグラフクラスターにマッピングした。検証のために、フェノグラフの「分類」モードにより実行されるように、2番目のマッピング方法を用いた（Levine et al. Cell. 2015, 162（1）：184-97）。トレーニングデータは、各サンプルから50,000個の細胞を刺激でサンプリングすることにより作成した。この分析のために、非刺激データおよび刺激後データの両方に共通する疲弊マーカーである、CTLA4、CD7、CD127、Helios、PD-1、CCR7、Eomes、CD38、TOX、TIGIT、CXCR5、2B4、LAG3、CD36を用いた。刺激されたサンプルのために、トレーニングデータおよび刺激されたサンプルからの細胞を用いて、Jaccardメトリックを用いる最近接グラフを作成した。グラフ全体のランダムウォーク確率を用いて、刺激された細胞の各々にクラスターを割り当てた。これらの調査結果は、血中の疲弊T細胞集団の評価のためのフレームワーク、ならびに、疲弊の重症度、疾患との関係、疾患の進行または介入による変化への追加の洞察を提供する。本発明は、癌免疫療法における診断、モニタリング、および標的同定の鍵となる主要な疾患関連TEX集団を評価することを可能にする。

【0221】

#### T細胞受容体シーケンシング

必要に応じてメスならびにガイドとしてヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色したスライドを用いて、FFPEスライドで手動のマクロ切開を行った。組織の脱パラフィンおよびDNA抽出は、標準的な方法を用いて行った。DNAは、Qubit dsDNA BR Assay（Invitrogen）を用いて定量した。末梢血CD8 T細胞を精製し、BD Aria Sorterを用いてPBMCから単離した。DNA抽出、増幅、ライブラリー調製、シーケンシング、および予備的パイオインフォマティクス分析は、Adaptive Biotechnologiesによって行った。TCRβ CDR3の増幅およびシーケンシングは、immunoSEQ Platform（Adaptive Biotechnologies）を用いて調査レベルの解像度で行った。

【0222】

#### PD-L1およびCD8の免疫組織化学、ならびに分析

ホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍を外科的切除時または生検から採取した。抗PD-L1染色のため、熱誘導抗原修復（Bond ER2、20分）の後、腫瘍スライドを1:50希釈の抗PD-L1抗体（E1L3N、Cell Signaling）で染色した。特異性を確認するために、抗PD-L1抗体はホジキンリンパ腫細胞および胎盤を染色することによって検証した。抗CD8染色のために、熱誘導抗原回復（Bond ER1、20分）の後、腫瘍スライドを1:40希釈の抗CD8抗体（M7103、Dako）で染色した。腫瘍浸潤CD8陽性T細胞は、盲検の専門家黒色腫病理学者によって、非存在、最小、軽度、中程度、および活発であるとスコアリングされた。腫瘍浸潤CD8 T細胞は、ImageJ2を用いる画像認識分析によっても分析した。デジタルスライドはライカ顕微鏡により取得した。CD8染色のRGBスタック画像をグレースケールに変換し、粒子（陽性染色）を100のしきい値を用いて10~625 μm<sup>2</sup>のサイズでカウントした。腫瘍の総面積は、腫瘍マスクを用いて計算した。

【0223】

#### RNAシーケンシングおよび分析

ソーティング後、細胞を再懸濁し、RLTバッファー（Qiagen）で凍結した。RNAは、製造元のプロトコルに従って、Qiagen RNeasyマイクロキット（Cat. No. 74034）を用いて単離した。RNA-seqライブラリーは、製造元のプロトコル（Cat. No. 635007）に従って、ClonetechnologyからSMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit for Pico Input Ma

10

20

30

40

50

mmalianを用いて調製した。ライブラリーは、900万～2060万のペアのマップされた読み取りの読み取り深度で、300サイクルの高出力フローセル (Cat. No. 15057929) を用いてIllumina NextSeqマシン上でシーケンシングした。Fastqファイルは、STAR 2.5.2aおよびhg19を用いて調整した。アラインされたファイルは、PORT遺伝子ベースの正規化 ([www.github.com/itmat/Normalization](http://www.github.com/itmat/Normalization)) を用いて処理した。差次的遺伝子発現はLimmaを用いて行った。Limma-voomを用いて、P値 0.05を用いてグループ間で有意に異なる転写物を同定した。サイクル1にKi67ピークがある患者 (3人の患者) について、MKI67と高い相関がある上位40の遺伝子で、MKI67相関遺伝子と相関する上位5遺伝子を含む相関ネットワークを作成した。最終的なネットワークには、MKI67と相関の高い (相関係数の絶対値 0.7 ( $\text{abs}(\text{corr}) = 0.7$ )) 値を持つノードがあった。Cytoscape 3.4.0は相関ネットワークの作成のために用い、metascape.orgはGO生物学的プロセスのための遺伝子を富化するために用いた。この出版物において議論されるデータはNCBI Gene Expression Omnibusに寄託されており、その全体が引用により本明細書に組み込まれる、GEOシリーズアクセッション番号GSE96578 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE96578](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE96578)) を介してアクセスできる。

#### 【0224】

##### 全エキソームシーケンシング、変異負荷分析、およびネオエピトープ予測

必要に応じてメスおよびガイドとしてH&E染色されたスライドを用いて、FFPEスライドで手動のマクロ解剖を行った。組織の脱パラフィンおよびDNA抽出は、標準的な方法を用いて行った。DNAは、Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen) を用いて定量した。DNAライブラリーは、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs)を用いて作成し、標的はSureSelect Human All Exon V6+ COSMIC (Agilent) でキャプチャした。OptiTypeおよびネオエピトープ (neoepitope) 予測を伴うHLAは、Ccons 1.1 Serverを用いて作成した。

#### 【0225】

##### 統計的手法ならびに分類および回帰ツリー (CART) 分析

グループ比較および相関分析のために、PRISM 6.0を用いてテストを行った。D'Agostino-Pearson omnibus正規性検定を用いて分布の正規性を評価し、F検定を用いてデータのグループ間の分散を評価した。正規分布データについて、平均差の有意性は、両側の (two-sided) 対応のある、または対応のないスチューデントのt検定を用いて決定し、分散が異なるグループについては、ウェルチの修正 (Welch's correction) を伴う対応のないt検定を用いた。非正規データについて、非パラメトリックマンホイットニーU検定 (Mann-Whitney U-tests) またはウィルコクソン一致対符号付き順位検定 (Wilcoxon matched-pairs signed rank tests) を、非対分析と対分析とにそれぞれ用いた。記述統計には、連続変数についての平均、中央値、標準偏差、および範囲、ならびに、カテゴリ変数についての頻度および比率が含まれる。連続変数間の相関関係はピアソンのr係数によって決定し、順序スケールされたカテゴリ変数間の相関関係はスピアマンのr係数 (Spearman's r coefficient) によって決定した。全生存期間は、処置の開始から死亡の日または患者との最後の接触までの生存期間として規定し、カプラン・マイヤー法によって推定した。ランドマークの全生存およびPFS分析は、治療後6週間からの全生存およびPFSとして規定した。Ki67 (最大6週目)、ベースラインの腫瘍負荷および臨床結果の関係を視覚的に検査するために、ベースラインの腫瘍負荷によってKi67の簡単な散布図を作成し、全生存、PFS、臨床応答などの臨床結果に色分けされた記号を採用した。一般に、平均は臨床結果の二分法 (dichotomization) のために用いた。これには、PennデータセットにおけるPFSおよびランドマークPFS (図27、図35)、ならびにMSKCCデータセットについてランドマークの全生存率 (図34G) が含まれる。Pennデータセットでは、ランドマークの全生存期間は、9.5か月のカットオフを用いて二分した。これは、最長の完全生存期間を表しているためである (すなわち、LOSが9.5か月未満の患者は生存しておらず、生存が検閲されない) (図34D、図35)。対数順位検定 (log rank test) を用いて、患者のサブグループ間の全生存を比較した。腫瘍負荷に対するKi67の比率は全

10

20

30

40

50

生存率と関連しており、CART分析によってさらに調査した。CARTは、この連続変数を全生存期間に従って2つの均一なサブグループに分割するための最適なカットポイントを同定した。この方法により、すべての可能なカットポイントから最適なカットポイントが選択される。生存およびCART統計分析は、IBM SPSS v23またはSTATA v14のいずれかを用いて行った。ランドマークPFSについて同様の分析を行った。

【0226】

#### モデル選択、主成分分析、およびフィッシャーの正確な計算

モデル選択は、一連の候補モデルの中からモデルを選択する方法である。Rパッケージ「leaps」バージョン2.9、パラメーター「nvmax = 3」、および「nbest = 10」を用いて、CD8およびKi67発現を予測するための線形回帰に基づいて10の最良のモデルを選択した。

10

【0227】

臨床パラメーターを予測変数として用い、Ki67を従属変数として用いた。この方法は、1変数、2変数、および3変数のすべてのモデルを評価し、変数の数によってペナルティが課されたベイズ情報量基準 (Bayesian information criterion : BIC) を用いて最適なモデルをランク付けする。BICスコアが低いほど、より良いモデルを示す。

【0228】

主成分分析は、3つの変数を視覚化するために用いた：腫瘍負荷、Ki67、および2次元空間での変異負荷。RパッケージfactoMinerは、主成分および各PCA変数に含まれる変数によって説明される分散のパーセンテージを計算および抽出するために用いた。

20

【0229】

フィッシャーの直接確率検定 (Fisher's exact test) を用いて、すべてのユニークなシーケンスされた末梢血クローン間で共有されたTCR CDR3クローノタイプ (上位10の腫瘍浸潤T細胞クローンと末梢血の間、図32A) が見つかる確率が、 $10^7$ の可能な末梢血クローノタイプの理論的な推定値で、偶然による腫瘍におけるクローンの発見の確率と異なるという仮説をテストした。P値は、R関数「fisher.test()」を用いて計算した。

【0230】

#### 高次元データ分析

CyTOFデータのビーズベースの正規化は、[www.github.com/nolanlab/bead-normalization/releases](https://www.github.com/nolanlab/bead-normalization/releases)から入手できるNolan labノーマライザーを用いて行った。FCSファイルは、市販のソフトウェアFlowJo v10 (TreeStar)、FCSEXPRESS 6 (DeNovo Software)、およびViSNE (Cytobank) によってさらに分析した。RベースのtSNE分析は、Rtsneパッケージを用いて行った。(Chen et al. PLoS Comput Biol. 2016, 12(9): e1005112; Levine et al. Cell. 2015, 162(1): 184-97) に記載されるcytofkitパッケージを介して実装されたRPhenographパッケージを用いてフェノグラフ分析を行った。視覚化のために、クラスタリング後にグラフから10000個のノードがサンプリングした (すなわち、クラスタリングは完全なデータセットに対して実行したが、読みやすさのためにサブサンプルのみが表示される)。結果のサブグラフは、ForceAtlas2の強制指向レイアウトアルゴリズム (Jacomy et al. PLoS One. 2014, 9(6): e98679) を用いてレイアウトした。VisneまたはPhenographを用いる疲弊データスペースの分析は、図24および図28に規定されるように疲弊特異的分子に対応するマスチャネルで実行した。イリジウムインターカレーター陽性、シングレットLD陰性CD45+ CD3+ CD8 T細胞の疲弊データスペースのフェノグラフ分析は、30個の高次元クラスターを同定し、そのうち5個 (c14、c20、c22、c24、c30) が品質管理ゲーティング後にCD8 T細胞の0.01%未満の細胞頻度を示し、下流の分析から除外した。

30

40

【0231】

#### 疲弊関数マッピング

直接表現型分析またはモネンシンおよびブレフェルジンAの存在下で37 °Cで5時間での完全培地中のPMA/イオノマイシンによる刺激のためにサンプルを分割し、マスサイトメトリー分析のために染色した。表現型と刺激のパネルとの間で共有される疲弊特異的マ

50

カーを用いて、共有tSNEベースの疲弊マップを作成した。フェノグラフィクラスターを反映するゲートを、この共有された疲弊マップで同定し、刺激されたサンプルからの対応するゲートでのサイトカイン発現を、フェノグラフィクラスターにマッピングした（図26も参照）。検証のために、フェノグラフィの「分類」モードにより行われるとおり、第2のマッピング方法を用いた（Levine et al. Cell. 2015, 162(1):184-97）。トレーニングデータは、刺激のある各サンプルから50kの細胞をサンプリングすることによって作成した。この分析のために、非刺激データおよび刺激後データの両方に共通する疲弊マーカーである、CTLA4、CD7、CD127、Helios、PD-1、CCR7、Eomes、CD38、TOX、TIGIT、CXCR5、2B4、LAG3、CD36を用いた。刺激されたサンプルごとに、トレーニングデータおよび刺激されたサンプルからの細胞を用いて、Jaccardメトリックを用いる最近傍

10

#### 【0232】

##### ヒートマップ表示

ヒートマップは、Pheatmap Rパッケージ（v. 1.0.8）を用いて生成した。色表現はZスコアに基づき、ヒートマップの横の図のカラーパレットで示される。

#### 【0233】

##### 統計分析およびデータ視覚化

統計分析は、JMP 12.2.0（SAS）、GraphPad Prism 7.02およびR 3.3.1 limmaパッケージを用いて行った。図29～31において、患者試料におけるフェノグラフィクラスター頻度の単純な回帰分析を行い、それぞれのピアソン相関をR ggplot2パッケージを用いてプロットした。

20

#### 【0234】

##### データの利用性

調査結果をサポートするRNAシーケンシングデータはNCBI Gene Expression Omnibusに登録されており、GEOシリーズのアクセッション番号GSE96578（[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE96578](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE96578)）を介してアクセスできる。フローサイトメトリー、TCRシーケンシング、および臨床データは、引用により全体として本明細書に組み込まれる、Huang et al. (Huang et al. Nature 2017, 4:545(7652):60-65, doi:10.1038/nature22079) およびそのExtended Data and Supplementary Informationに含まれる。

30

#### 【0235】

##### 実施例10～18の材料および方法

##### 患者集団および検体採取

血液は、すべての研究参加者の書面によるインフォームドコンセントおよびペンシルバニア大学機関審査委員会（University of Pennsylvania Institutional Review Board）の承認を得て取得された。HIV試料は、Penn Center for AIDS Research (CFAR) (IRB# 815056)を通じて取得され、肺癌について血液および組織試料が取得され（IRB# 813004）、健常対照者について血液が取得された（IRB# 820151）。PBMCおよびTILは、記述されているように抽出した（Huang et al. (2017) Nature 545:60-65; Quatromoni et al. (2015) J Leukoc Biol 97:201-209）。

40

#### 【0236】

##### トランスクリプトームおよびエピゲノムデータ分析

アクセッション番号GSE41867でGene Expression Omnibus（GEO）データベース（[www.ncbi.nlm.nih.gov/gds](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds)）から入手できるLCMV特異的T細胞の転写プロファイリングは、Doering et al. (Doering et al. (2012) Immunity 37:1130-1144)に記載される。ATAC-Seqデータは、Pauken et al. Science (2016) 354(6316):1160-1165 およびSen et al. (2016) Science 354(6316):1165-1169 (GSE97646、GSE86881)に記載される。転写プロファイリングデータはGEOからダウンロードし、R 3.3.1および

50

GEOqueryパッケージを用いて注釈が付けられた。ATAC-Seqオープンクロマチン領域 (OCR) 分析は、Pauken et al. Science (2016) 354(6316):1160-1165 および Sen et al. (2016) Science 354(6316):1165-1169 (GSE97646、GSE86881) のように行った。疲弊特異的トランスクリプトームおよびエピゲノムの発現パターンの同定は、limma パッケージで計算されたモデレートされたベイズ統計を使用して実行した。具体的には、モデレーテッドT統計が $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、および $T_{MEM}$ と比較して ( $\lambda = 2.9$ ) である場合、ウイルス特異的 $T_{EX}$ において上方制御または下方制御された遺伝子を選択された。

#### 【0237】

##### 遺伝子富化および変異分析

Broad Instituteソフトウェア ([www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp](http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp)) を用いる遺伝子セット富化分析 (GSEA) を、GEOからのマイクロアレイデータに対して行った。疲弊特異的遺伝子シグネチャを、GSEAによってテストした。GSEAによって取得された正規化富化スコア (NES) およびリーディングエッジ (LE) 遺伝子は、図1、2、および3におけるさまざまなデータセット全体の比較のために用いた。図8では、GSVA Rパッケージを用いる遺伝子セット変動分析 (GSVA) (Hanzelmann et al, (2013) BMC Bioinformatics 14:7) を、(Tirosh et al. (2016) Science 352:189-196) からの単一細胞トランスクリプトームデータを調査するため、および腫瘍微小環境におけるさまざまな疲弊遺伝子セットを評価するために行った。要約すると、CD8 T細胞の単一細胞データはNIH GEO (GSE72056; [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE72056)で入手可能) から取得し、単一細胞データのGSVAは、完全なエピゲノムのおよびトランスクリプトーム的に規定された疲弊遺伝子リスト、または後にCyTOFによって分析される遺伝子のサブセットを用いて行った。UPおよびDOWN制御された遺伝子リストを用いるGSVA分析の結果を用いて、GSVA枯渇スコア ( $GSVA\_score\_UP - GSVA\_score\_DN$ ) を計算した。

#### 【0238】

##### 細胞選別および $T_{EFF}$ 活性化のためのインビトロ培養

PBMCまたはソートされたT細胞集団を、L-グルタミン、10%FCSおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加した補足培養培地 (RPMI 1640 (Gibco)) で72時間20 U/ml IL-2 (Stemcell) の存在下で抗CD3/CD28ビーズ (Miltenyi Biotec) で刺激した。抗-CD27-BV785 (クローン O323)、抗-CD45RA-BV605 (クローン HI100)、抗-PD-1-BV421 (クローン E12.2.H7)、抗-CD8 APC-Fire (クローン RPA-T8) (Biolegend)、抗-CCR7-FITC (クローン 150503) (BD Biosciences)を用いて、 $T_N$  (CCR7+CD45RA+CD27+)、 $T_{CM}$  (CD27+CD45RA-CCR7+)、 $T_{EM}$  (CD27-CCR7-CD45RA-)、 $T_{EMRA}$  (CD27-CCR7-CD45RA+) および PD-1+ 集団を染色した後、および生/死試薬 Ghost Violet (Tonbo)で染色した後、FACS Aria II (BD Biosciences)でソーティングを行った。

#### 【0239】

##### マスサイトメトリー

マスサイトメトリー試薬は、Fluidigmから入手したか、または、MAXPARキット (Fluidigm) を用いてアイソトープがロードされたポリマーへのカスタム結合によって生成した。用いたマスサイトメトリー抗体を表5に示す。以下に基づいて、マスサイトメトリーのために疲弊特異的マーカーを選択した：1)  $T_{EX}$ の転写シグネチャの存在 (ユニーク上方または下方制御)；2) 遺伝子座におけるユニークな $T_{EX}$ 特異的エピジェネティック変化の存在 (獲得または喪失)；および3) CyTOFのため適した抗体の利用可能性、結合前またはインハウス結合および検証後。(Bengsch et al. (2017) J Immunol Methods 453:3-10)に記載されるように染色を行った。簡単に言えば、単一細胞懸濁液をペレット化し、PBS中の20  $\mu$ Mランタン-139 (Trace Sciences) をロードしたマレイミド-モノ-アミン-DOTA (Macrocylics) で、室温で10分間、生/死の識別 (LD) のためにインキュベートした。細胞を染色バッファーで洗浄し、表面抗体カクテルに再懸濁し、RTで30分間インキュベートし、染色バッファーで2回洗浄し、FoxP3染色バッファーセット (eBioscience) を用いて固定化および透過処理し、RTで60分間細胞内染色した。細胞をさらに2

回洗浄した後、125nMイリジウムを含む1.6%PFA (Electron Microscopy Sciences) 溶液で一晩4℃で固定化した。CyTOF2 (Fluidigm) でのデータ収集の前、およびCyTOF Helios (Fluidigm) での反復コホート実験において、細胞をPBSで2回、dH2Oで1回洗浄した。57人の患者からのサンプルのマスサイトメトリーデータは、異なるバッチで取得した。特に、図40～43で分析されたサンプルは、類似するCyTOF機器パフォーマンスで、同じコア抗体を用いて3つのバッチで取得した。バッチコントロールのために、ビーズベースの正規化を用い、それぞれのバッチで単一のコントロールドナーからのPBMCを分析し、高次元分析で同様の結果を示した(データは示さない)。その後、後の時点で染色され、異なるマスサイトメーターで取得された同じ起源の出血日からの患者サンプルを再分析することにより、繰り返しのコホート分析を行い、元の分析と同様の結論が得られた(図39、図45)。

10

【0240】

#### 高次元データ分析

CyTOFデータのビーズベースの正規化は、[github.com/nolanlab/bead-normalization/releases](https://github.com/nolanlab/bead-normalization/releases)から入手できるNolan labノーマライザーを用いて行った。FCSファイルは、市販のソフトウェアFlowJo v10 (TreeStar)、FCSEXPRESS 6 (DeNovo Software)、およびVisNE (Cytobank) によってさらに分析した。RベースのtSNE分析は、Rtsneパッケージを使用して実行した。フェノグラムは、(Chen et al. (2016) PLoS Comput Biol 12, e1005112; Levine et al. (2015) Cell 162:184-197) に記載される、cytofkitパッケージを介して実装されたRPhenographパッケージを用いて行った。VisNE またはフェノグラムを用いた疲弊データスペースの分析は、図37および38で規定されるように疲弊特異的分子に対応するマスチャネルで行った。イリジウムインターカレーター陽性、シングレットLD陰性CD45+CD3+CD8 T細胞での疲弊データスペースのフェノグラム分析は、30個の高次元クラスターを同定し、そのうち5個(c14、c20、c22、c24、c30)は、品質管理ゲーティング後に細胞頻度 0.01%のCD8 T細胞を示し、下流の分析から除外した。フェノグラムおよびVisne分析の後、データはfcsファイルに統合し、FlowJoまたはFCSEXPRESSによってさらに処理した。

20

【0241】

#### 疲弊関数マッピング

直接表現型分析、またはモネンシンおよびプレフェルジンAの存在下で37℃で5時間の完全培地中のPMA/イオノマイシンによる刺激のためにサンプルを分割し、マスサイトメトリー分析のために染色した。表現型検査 (phenotyping) と刺激パネルとの間で共有される疲弊特異的マーカー(「スキャフォールド」)を用いて、フェノグラムの「分類」モードにより刺激後のサンプルを刺激前のクラスターにマッピングした(Levine et al. (2015) Cell 162:184-197)。刺激を伴う各サンプルから等しい量の細胞(50000)をサンプリングすることにより、トレーニングデータを作成した。非刺激データと刺激後データの両方に共通する疲弊マーカーであるCTLA4、CD7、CD127、Helios、PD-1、CCR7、Eomes、CD39、TOX、TIGIT、CXCR5、2B4、LAG3をこれらの分析のために用いた。刺激されたサンプルごとに、トレーニングデータおよび刺激されたサンプルからの細胞を用いて、Jaccardメトリックを用いる最近傍グラフを作成した。グラフ全体のランダムウォーク確率を用いて、刺激された各細胞にクラスターを割り当てた。より詳細な記載についてLevine et al. (2015) Cell 162:184-197をご参照ください。次に、機能疲弊スコア(FES)を、IL-2およびCCL3の生産、ならびにIFN- $\gamma$  およびTNFの同時生産( $2 \times (\%IFN^+TNF^+) - (\%IFN^+TNF^-) - (\%IL-2^+) \times (\%CCL3/4^+)$ )を用いて計算した。

30

40

【0242】

#### ヒートマップ表示

ヒートマップは、Pheatmap Rパッケージ(v. 1.0.8)を用いて生成した。色表現はZスコアに基づき、ヒートマップの横の図のカラーパレットで示される。

【0243】

#### 統計分析およびデータ視覚化

50

統計分析は、JMP 12.2.0 (SAS)、GraphPad Prism 7.02およびR 3.3.1 limmaパッケージを用いて行った。図4 1～4 3におけるグループ比較は、ウェルチの修正 (Welch's correction) を伴う対応のないt検定を用いて行った。図4 1および4 2では、ウイルス負荷およびCD4/CD8比に対して、ウイルス血症のHIV患者サンプルにおけるフェノグラフクラスター頻度の単純な回帰分析を行った。それぞれのピアソン相関は、R ggplot2パッケージを用いてプロットした。図4 1 Gおよび4 3 Cに示されるクラスタードットサイズは、個々のクラスターの存在量に比例的にスケーリングした (CD8の%)。図4 2および4 3では、サンプルあたりのフェノグラフクラスターのパーセンテージの合計を、図4 1および4 2に示される最も高いFESでのトップ2クラスターおよびトップ9クラスター、図4 2に示されるHIV (DAT/HAT) における疾患 - または健常関連TEXクラスターについて計算した。さらに、HATの頻度の合計で割ったDATの頻度の合計を用いてTEX比率を計算し、疾患全体にわたるさまざまな品質のTEXの組成の歪みを評価した。

10

【0 2 4 4】

次に、実験の結果を記載する。

【0 2 4 5】

実施例 1：抗PD-L1は、処置の停止後に持続しないTEX細胞におけるエフェクター様転写プログラムを誘導する。

PD-1経路遮断に関連する細胞性、転写性、およびエピジェネティックな変化は、慢性リンパ性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 感染のマウスモデルを用いて調べた (図1 A～図1 C) (Barber et al. Nature. 2006, 439(7077):682-7; Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165 - Supplemental Information on Science online)。抗PD-L1処置の後、1080個の遺伝子が上方制御され、1686個の遺伝子が下方制御された (p 0.05, LFC 0.2) (図2 A、図1 D、および Pauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。以前の研究は、PD-1経路遮断後の代謝経路における転写 (Gubin et al. Nature. 2014, 515:577-581) または細胞性 (Bengsch et al. 2016, Immunity 45, 358-373; Staron et al. 2014, Immunity 41, 802-814) の変化を同定した。実際、いくつかの代謝遺伝子はPD-L1遮断後に変更した (Pauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。しかしながら、遺伝子セット富化分析 (GSEA) は、細胞分裂経路におけるより顕著な変化を同定した (図2 B、Pauken et al. Table S2 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)) (Barber et al. Nature 2006, 439, 682-687; Patsoukis et al. Sci. Signal. 2012, 5, ra46)。さらに、多くのエフェクター関連遺伝子は抗PD-L1グループに偏っていた (図2 C～2 D、Pauken et al. Table S3 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。関心のある他の遺伝子には、Cxcl9、Il1r2およびIl17r (上)、ならびに、Klra9、Tnfrsf9、およびCd200r2 (下) が含まれる (図1 DおよびPauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。Leading Edge Metagene (LEM) 分析 (Godec. Immunity. 2016, 44:194-206) を用いて、対照TEXと比較して、抗PD-L1処理TEXにおいて2つのメタ遺伝子が同定された：1つは白血球の活性化に対応し、もう1つは細胞周期に対応する (図2 E、図1 E、および1 F、およびPauken et al. Table S4 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。抗PD-L1処理TEXメタ遺伝子は、主に細胞周期経路によって駆動されるTEFFとの一部の重複を示したが、T<sub>MEM</sub>との重複は最小限であった (図2 EおよびPauken et al. Table S4 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。このことは、TEX再活化時のメモリーポテンシャルの限られた獲得を示唆する。

20

30

40

【0 2 4 6】

PD-1経路遮断はTEXにおいて機能を再活性化することができるが、再活化が持続する否かは不明である。ここでは、予想どおりTEXが強力に再活化され (図2 F、2 G、1 A、1 B、および3) (Barber et al. Nature 2006, 439, 682-687)、拡張は遮断の開始後約3週間でピークに達した。しかしながら、処置後8～11週までに、この再活化は失わ

50

れ、抗PD-L1処置マウスにおけるLCMV特異的CD8 T細胞の量、増殖、エフェクター機能、および抑制性受容体発現は、対照処理マウスに匹敵した（図2F～2H、および図3～5）。さらに、抗PD-L1処置は処置直後のウイルス負荷を減少させたが、4か月後のウイルス負荷は対照処理マウスと同様であった（図2I）。最後に、遮断の停止後18～29週で、対照および抗PD-L1処理グループの転写プロファイルは類似した（図2J、図6および7、ならびにPauken et al. Tables S5 およびS6 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)）。まとめると、これらのデータは、抗原が高いままである場合、PD-1経路遮断によって再活化されたT<sub>EX</sub>は「再疲弊」されることを示す。

#### 【0247】

実施例2：PD-1経路遮断は、T<sub>EX</sub>における抗原非依存性持続およびIL-7シグナル伝達を中程度に改善する。

10

PD-L1遮断の効果が持続しなかった1つの考えられる理由は、感染が持続したことである。感染が治癒した場合に抗PD-L1がT<sub>MEM</sub>への分化を誘導し得るという考えをテストするために、同数の対照T<sub>EX</sub>、抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>、またはT<sub>MEM</sub>を無抗原マウスに移入し、持続性を監視した（図8A）。以前の研究と一致して（Shin, et al. J. Exp. Med. 2007, 204: 941-949; Wherry, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101:16004-16009）、T<sub>EX</sub>は機能的なT<sub>MEM</sub>と比較して無抗原レシピエントにおいて低い生存であった（図9A～9B）。抗PD-L1で処理されたT<sub>EX</sub>は、T<sub>MEM</sub>に比べると不十分であったが、中程度に持続する傾向があった（図9A～9B）。次に、この傾向の潜在的なメカニズムを調査した。PD-1経路遮断後、インターロイキン（IL）-7受容体転写物（IL7r; CD127）は有意に増加した（図1DおよびPauken et al. Table S1 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)）。抗PD-L1後のT<sub>EX</sub>のサブセットでCD127タンパク質の適度な増加もあった（図9C～9E）。IL-7で刺激すると、抗PD-L1で処理されたT<sub>EX</sub>は、対照で処理されたT<sub>EX</sub>と比較して、より多くのphospho-STAT5も示した（図9Fおよび図8B）。対照的に、IL-15受容体サブユニットCD122の発現およびインビトロでのIL-15に対する応答性は実質的に変化しなかった（図9Cおよび9F、および図8B）。これらのデータは、抗PD-L1処置がメモリーバイアスIL-7R経路の活性を増強し得ることを示唆する。

20

#### 【0248】

エフェクター段階から始まるIL-7での処置は、疲弊の発達を防ぐことができる（Pellegri, et al. Cell 2011, 144: 601-613; Nanjappa, et al. Blood 2011, 117: 5123-5132）。しかしながら、慢性感染の後期では、T<sub>EX</sub>はIL-7にほとんど反応しない（Shin, et al. J. Exp. Med. 2007, 204: 941-949; Wherry, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101: 16004-16009）。抗PD-L1はIL-7Rシグナル伝達を改善したため、併用処置に追加の利点があるか否かをテストした（図8C）。実際、反応の他の側面への影響は少ないものの、IL-7単独ではない、IL-7と抗PD-L1による処置は、より多くの抗原特異的CD8 T細胞をもたらし、IFN とTNF の同時生産を改善した（図9G～9H、および図8D～8H）。したがって、チェックポイント遮断を改善するために、IL-7Rを含むPD-L1遮断によってアップレギュレートされた経路を活用することが可能であり得る。

30

40

#### 【0249】

実施例3：PD-1経路遮断は、メモリー様想起能力を回復せず、またはT<sub>EX</sub>のエピジェネティックな景観をT<sub>EFF</sub>またはT<sub>MEM</sub>細胞に再プログラミングしない。

次に、PD-1経路の遮断がT<sub>MEM</sub>の定義的特性である再感染時の強力なりコールの可能性を復元できるか否かをテストした。等しい数のD<sup>b</sup>GP33<sup>+</sup> CD8 T<sub>EX</sub>、抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>、またはT<sub>MEM</sub>を無抗原マウスに移入し、休ませ、そしてGP33-41を発現するリステリア菌（*Listeria monocytogenes*）で再チャレンジした。T<sub>MEM</sub>は強力に拡大し、効率的にIFN を産生した（図10A～10D）。対照的に、対照および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>は両方ともリステリアGP33チャレンジに対する応答が乏しく、再活化されたT<sub>EX</sub>はこれらの重要な特性において対照T<sub>EX</sub>と同様に不完全であった（図10A～10D）。

50



## 【0250】

抗原除去後、T<sub>EX</sub>および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>はPD-1のダウンレギュレーションに失敗し（図10E）、Pdcd1遺伝子座のDNAメチル化およびPD-1の長期発現と一致した（Youngblood et al. *Immunity* 2011, 35:400-412; Utzschneider et al. *Nat. Immunol.* 2013, 14:603-610; Angelosanto et al. *J. Virol.* 2012, 86:8161-8170）。T<sub>EX</sub>はまた、全体的なジアセチル化ヒストンH3が低い（Zhang et al. *Mol. Ther.* 2014, 22:1698-1706）が、これが分化といかに関連するかは不明である。T<sub>EX</sub>のゲノム全体のエピジェネティックな景観がPD-1経路遮断後の永続的な改善の欠如に寄与し得るか否かをテストするために、グローバルクロマチンランドスケープマッピングをATAC-seqを用いて行った（Buenrostro, et al. *Nat. Methods* 2013, 10:1213-1218）（図11）。同定されたオープンクロマチン領域（OCR）の大部分は、予想どおり（Winter et al. *J. Immunol.* 2008, 181:4832）、遺伝子間領域（33.3~43.3%）またはイントロン（43.4~48.5%）に存在した（図12A）。T<sub>EFF</sub>、T<sub>MEM</sub>、およびT<sub>EX</sub>は、T<sub>N</sub>と比較して実質的なクロマチンリモデリングを示し（図3Fならびに図12Bおよび12C）、20 kbのOCR内に転写開始部位（TSS）を持つ遺伝子は、より高度に発現される傾向があった（図13）。特定の遺伝子のOCRは、T<sub>EFF</sub>、T<sub>MEM</sub>、T<sub>EX</sub>の異なるパターンを示した。たとえば、T<sub>EX</sub>には、T<sub>EFF</sub>およびT<sub>MEM</sub>のIfng遺伝子座に存在するいくつかのOCRがなかった（図3G、青いボックス）。同様に、Pdcd1の場合、T<sub>EX</sub>特異的OCRは、「B」および「C」領域で（図3G、黒ボックス）（Staron et al. 2014, *Immunity* 41:802-814; Oestreich, et al. *J. Immunol.* 2008, 181:4832-4839; Kao et al. *Nat. Immunol.* 2011, 12:663-671）、以前は未同定のTSSからOCR約23 kbで（図3G、赤いボックス）同定された。グローバル階層クラスタリングおよび共クラスタ分析は、T<sub>EFF</sub>およびT<sub>MEM</sub>がT<sub>EX</sub>よりも互いに類似していること、ならびに、T<sub>EX</sub>が明確なグローバルなエピジェネティックなランドスケープを有していることを示した（図3、H~J、および図14~16）。これらのデータは、T<sub>EX</sub>がCD8 T細胞の異なる系統を示し得ることを示唆する。

## 【0251】

Eomes、T-betおよびPD-1の発現に基づいて、T<sub>EX</sub>の2つのサブセットが規定されており（Paley et al. *Science* 2012, 338:1220-1225; Blackburn, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105:15016-15021）、追加的な異質性が最近記載されている（He, et al. *Nature* 2016, 537:412-428; Im, et al. *Nature* 2016, 537:417-421; Utzschneider, et al. *Immunity* 2016, 45:415-427）。T-bet<sup>hi</sup>Eomes<sup>lo</sup> PD-1<sup>int</sup>サブセットはPD-1経路遮断によって再活化できるが、Eomes<sup>hi</sup>PD-1<sup>hi</sup>サブセットはより末期的であり、PD-1の遮断に対する乏しく応答であった（Paley et al. *Science* 2012, 338:1220-1225; Blackburn, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105:15016-15021）。ここで、T<sub>EX</sub>は約80%のEomes<sup>hi</sup>および約20%のT-bet<sup>hi</sup>であり、この分布は抗PD-L1処理で最小限に変化した（図17A~17C）。T<sub>EX</sub>および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>の転写およびエピジェネティックプロファイルは、Eomes<sup>hi</sup>サブセットからの遺伝子について有意に富化された（図17Dおよび17E）（Doering, et al. *Immunity* 2012, 37:1130-1144）。しかしながら、抗PD-L1処理グループにおけるPD-1<sup>int</sup>Tbet<sup>hi</sup> T<sub>EX</sub>サブセットからの遺伝子の富化への傾向もあり（図17Fおよび17G）、おそらくTbet<sup>hi</sup>細胞のEomes<sup>hi</sup>細胞への最近の変換または追加の不均一性を反映している。

## 【0252】

次に、PD-1経路遮断がT<sub>EX</sub>のエピジェネティックな景観を再プログラムする能力を調べた。階層的クラスタリング、共クラスタリング、および主成分分析は、対照と抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>との間にかなりの類似性を示した（図10H~10J、および図14）。T<sub>EX</sub>および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>の両方で優先的に見られるOCRは、Pdcd1、Il10、Ctla4、Cxcr5などの近くに位置し、PD-L1遮断後に実質的に変化しなかった状態特異的な調節を示唆する（図16）。全体的にエピジェネティックな変化は穏やかであったが、共クラスタ分析は、T<sub>EX</sub>（555ピーク）または抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>（98ピーク）においてユニークに富化されたOCRの小さなサブセットを同定した（図10H~10I、図16;およびPauken et al

l. Table S7 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。これらの遺伝子のいくつかは、エピジェネティックおよび転写的に同じ傾向を示し(たとえば、CD200r; 図13E)、特定の生物学的経路は、変化したOCRの近くの遺伝子のセットにおいて富化された(図18)。

#### 【0253】

実施例4：PD-1経路遮断後の示差的転写因子結合は、T<sub>EX</sub>の再活化中に転写ネットワークの変化に寄与する。

T<sub>EX</sub>は、T<sub>EFF</sub>およびT<sub>MEM</sub>と比較して約6000のユニークなOCR変化を示した(図10F~10I)。したがって、PD-L1遮断によって誘導された約650のOCR変化は、比較すると控えめであった。これらの変化が特定の転写回路に影響を与えるか否かを判断するために、得られた(たとえば、NF B、Jun: AP1、およびCTCF)または失われたピークにおいて富化された転写因子(TF)モチーフを同定した(たとえば、NFATc1、NFAT: AP1、Nur77、EomesおよびEgr2)(図19A)。再活性化が既存のT<sub>EX</sub>エピジェネティックランドスケープ内の再配線された転写制御に起因するか否かをテストするために、ウェリントンブートストラップ分析を実行して、TF結合活性を予測した(図19BおよびPauken et al. Table S10 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165)。T<sub>EX</sub>および抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>は、T<sub>N</sub>、T<sub>EFF</sub>またはT<sub>MEM</sub>よりも互いに類似していた。しかしながら、T<sub>EX</sub>または抗PD-L1処理T<sub>EX</sub>に偏ったTFモチーフが同定された(図19BおよびPauken et al. Table S10 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。次に、結合の可能性が高い証拠でTFを同定するために、TFフットプリンティングを行った(図19Cならびに図20および21)。次に、予測されたTF活性に基づいて、転写回路用のために統合ネットワークを構築した(図19DおよびPauken et al. Table S11 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。このネットワークは、NF B、IRF、およびbZip因子(AP-1ファミリー)の増加した活動、ならびに、PD-L1遮断時のNFAT、Egr2、およびNur77の減少した活動を同定した。この転写ネットワークの主な機能は、追加のTFファミリーが同定された2番目のネットワークアプローチを用いて要約された(たとえば、Runx、Nr2f6、Prdm1、Rarb、Pparg.Rxra、およびホメオボックスTF; 図22およびPauken et al. Table S12 (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165))。これらの変更が特定のTFにどのように影響するかをさらに調査するため、NFATを調査した。AP-1を使用するNFATは、多くのエフェクターフェーズ遺伝子をトランス活性化する。対照的に、AP-1に結合できない「パートナーレス」のNFATは、T<sub>EX</sub>遺伝子のサブセットを誘導する(Martinez, et al. Immunity 2015, 42: 265-278)。ここでは、抗PD-L1処置時に、再活化されたT<sub>EX</sub>においてパートナーレスNFATのターゲットの発現が有意に減少し(図19E)、遮断後のこの転写回路の再配線を示唆する。

#### 【0254】

これらのデータをまとめると、PD-1経路遮断はT<sub>EX</sub>をT<sub>MEM</sub>またはT<sub>EFF</sub>に完全に再プログラムしなかったものの、これらの細胞はT<sub>EFF</sub>生物学の特定の特徴を(再)獲得し得ることを示唆した。1つの仮説は、PD-L1遮断時に、再配線された転写ネットワークにより、T<sub>EX</sub>がT<sub>EFF</sub>と重複するエピゲノムプログラムの特徴を優先的に再利用できるようになるというものである。このアイデアをテストするために、TFターゲット遺伝子を次のOCRを含むものに分離した: a) T<sub>EFF</sub>にユニークなもの; b) T<sub>EX</sub>にユニークなもの; またはc) T<sub>EFF</sub>とT<sub>EX</sub>との間で共有されるもの(図19F)。次に、PD-L1遮断後の各カテゴリーにおいて発現された遺伝子の変化を調べた。T-betおよびEomesを含むいくつかのTFでは、標的遺伝子発現のパターンの再分布はなかった(図19F)。しかしながら、NF B、IRF1、IRF2、Nur77、およびBlimp-1(Prdm1によってコードされる)などのエフェクター生物学において重要な役割を有する上記で同定された多くのTFでは、PD-L1遮断時のT<sub>EX</sub>のみのグループと比較して、T<sub>EFF</sub>およびT<sub>EX</sub>オーバーラップグループにおいて発現された標的遺伝子の数が増加した(図19F)。さらに、共有されたT<sub>EFF</sub>およびT<sub>EX</sub>エピジェネティックモジュールにおける遺伝子は、T<sub>EX</sub>のみのグループにおける遺伝子よりも実質的

10

20

30

40

50

に大きな発現の変化を示した（図19F）。これらのデータは、PD-1経路の遮断が再配線された転写活性を誘導し、T<sub>EX</sub>がT<sub>EX</sub>のエピジェネティックな景觀に含まれるエフェクター遺伝子のモジュールをより効果的に再結合できるようにすることを示す。NF- $\kappa$ Bなどの変更された特定のTF回路は、PD-1およびTNFRファミリーの経路を同時標的化するための関係を有し得（Wherry et al. Nat. Rev. Immunol. 2015, 15:486-499; Sharma et al. Science 2015, 348:56-61; Ward-Kavanagh, et al. Immunity 2016, 44:1005-1019）、将来の治療法の設計に関連し得る。

#### 【0255】

上記のデータは、重度のT細胞疲弊の状況で、特に腫瘍またはウイルス抗原が持続する場合、耐久性のある免疫記憶の再取得がチャレンジングであり得ることを示す。しかしながら、データは、PD-1経路遮断が、T細胞の品質またはエフェクター活性（たとえば、NF- $\kappa$ B、IL-7R）をさらに増強する機会を明らかにし得ることも示す。新しいT細胞応答のプライミング（Sharma et al. Science 2015, 348:56-61）、疲弊の少ないサブセットの選択的拡大（Blackburn et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105:15016-15021）、または複数の免疫調節経路もしくは恒常性経路（たとえば、IL-7、IL-2）の同時のターゲティング（Wherry et al. Nat. Rev. Immunol. 2015, 15:486-499; Sharma et al. Science 2015, 348:56-61）などの追加的な戦略はまた、耐久性のある免疫性の獲得を増強し得る。これらの研究は、エピジェネティックなランドスケープマッピングをヒトT<sub>EX</sub>に拡張するための推進力、エピジェネティックな修飾因子と組み合わせたチェックポイント遮断の将来的評価、またはT細胞のためのエピゲノムエンジニアリングを提供する。したがって、T<sub>EX</sub>の統合された細胞の、転写的、およびエピジェネティックなプロファイリングは、PD-1経路遮断を介した再活化への機械的な洞察を明らかにするだけでなく、これらの効果の長期的な耐久性を改善する重要な機会も示す。

#### 【0256】

実施例5：抗PD-1療法に応答するCD8<sup>+</sup>T細胞は、疲弊表現型を示す。

健康なドナー対黒色腫患者を比較した。抗PD-1抗体ペンブロリズマブ（pembro）で処置されたステージIV黒色腫の29人の患者を、本明細書に記載される臨床試験に登録した。すべての患者は以前に抗CTLA-4療法を受けていた（図23）。患者をpembroで処置し、治療前、および治療中は3週間ごとに合計12週間、血液を採取した。患者の62%は、公表されている試験と一致する、免疫RECIST（固形腫瘍における応答評価基準）基準に基づいて決定された客観的な臨床応答を有さなかった（Robert et al. N. Engl. J. Med. 2015, 372:2521-2532; Ribas et al. Lancet Oncol. 2015, 16:908-918）（図24a、図23）。

#### 【0257】

メラノーマ患者からの末梢血T細胞を、最初に、高次元フローサイトメトリーを用いて、年齢が一致した健康なドナーからのものと比較した。抑制性受容体（PD-1、CTLA-4、2B4、およびTIM-3）のCD4およびCD8<sup>+</sup>T細胞、メモリーT細胞サブセット、ならびにCD4およびCD8<sup>+</sup>T細胞共発現の頻度は類似していた（データは示さない）。しかしながら、黒色腫の患者は、より高頻度のCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T細胞、およびFOXP3<sup>+</sup>細胞によるKi67発現を有した（図25a）。メラノーマの患者からのCD8<sup>+</sup>T細胞（P=0.0001、図25b）においても、主にPD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞サブセット（P=0.0001、図25c）において、Ki67発現が増加し、このことは既存の免疫反応を示唆する。

#### 【0258】

抗PD-1に対する薬力学的免疫応答が観察された。Ki67は、チェックポイント遮断時のマウスモデル（Blackburn et al. Nat. Immunol. 2009, 10:29-37）、ならびに、抗CTLA-4治療および放射線療法を受けているヒト（Twyman-Saint Victor et al. Nature 2015, 520:373-377）における細胞増殖およびT細胞再活性化のマーカーである。したがって、Ki67発現の変化をより詳細に調べた。実際、Ki67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、pembro処置後3週で増加し、その後ほとんどの患者で減少した（図24B）。応答するKi67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞集団は主にCD45RA<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup>であり、CTLA-4、2B4、およびPD-1の発現が高

い細胞が含まれた(図24C)(抗IgG4検出アプローチを使用(Brahmer et al. J. Clin. Oncol. 2010, 28:3167-3175、実験例の材料および方法、ならびに図26Aを参照)。さらに、応答するKi67<sup>+</sup>細胞はEomes<sup>hi</sup>およびT-bet<sup>lo</sup>であり(P=0.0001、図24C)、T<sub>EX</sub>細胞の表現型と一致した(Blackburn et al. Nat. Immunol. 2009, 10:29-37; Paley, et al. Science 2012, 338:1220-1225)。対照的に、健康なドナーにおけるKi67<sup>+</sup>集団は主にEomes<sup>hi</sup>T-bet<sup>hi</sup>およびCD27<sup>lo</sup>であり、エフェクターの表現型と一致した(図26B、26C)。CD8T細胞に加えて、Ki67は主に各集団のPD-1<sup>+</sup>サブセットにおいて、pembro処置後のFOXP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞およびFOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞において増加した(図25D)。FOXP3<sup>-</sup>およびFOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞応答のいずれも臨床結果と関連しなかった(図25E、25F)。

10

#### 【0259】

Ki67発現の増加は、PD-1<sup>+</sup>対PD-1<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞で最も顕著であった(P=0.0001; 図24D)。さらに、PD-1<sup>+</sup>サブセットにおけるこのKi67応答は、PD-1<sup>-</sup>サブセットと比較して、処置後3週間でピークに達した(P=0.0001、図24E)。抗CTLA-4療法の最後の投与からの時間は、その後のpembro後のKi67レベルまたは処置応答と相関せず(図27A~27C)、このことは、この例で観察された免疫学的応答は主に抗PD-1療法によるものであることを示唆する。健康なドナーでは、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞によるKi67発現は3週間でほとんど変化せず、1.1倍±0.37の変化であった(図26d)。対照的に、黒色腫の患者の大多数(27人中20人)は、処置後にPD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞におけるKi67の生物学的に意味のある増加を有した(図24F、図23)。この74%の免疫学的応答率にもかかわらず、臨床的応答を達成したのはわずか38%であり、pembroに対する免疫学的応答を示すすべての患者に臨床的利益があるわけではないことを示す。

20

#### 【0260】

実施例6：疲弊表現型CD8<sup>+</sup>T細胞は、抗PD-1療法によって優先的に再活化される。

末梢血において再活化されたT<sub>EX</sub>細胞が検出された。次に、PD-1および他の抑制性受容体を共発現するCD8<sup>+</sup>T細胞がPD-1遮断の薬力学的効果を追跡する上でより高い精度を供するか否かを評価した。PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の循環集団は、主に、Eomes<sup>hi</sup>T-bet<sup>lo</sup>およびCD45RA<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup>であった(図28A)。さらに、PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>細胞の約50%が処理前にKi67を発現し、マウスにおけるT<sub>EX</sub>細胞に関するデータと一致し(Paley et al. Science 2012, 338:1220-1225)、これは処置後に約75%に増加した(図28B、28C)。PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>-</sup>T細胞では、実質的により低いKi67発現があった(図28C)。第3の抑制性受容体(たとえば、2B4)の追加、または最近の記載に焦点を当ててPD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>TCF-1<sup>+</sup>サブセット(Im et al. Nature 2016, 537:417-421; He et al. Nature 2016, 537:412-416)は、抗PD-1療法に応答する細胞についてさらに富化された(図28C、図29)。さらに、IFN $\gamma$ 産生PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>およびPD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>サブセットは、T<sub>EX</sub>細胞の活化と一致して、抗PD-1処置後に増加した(図29G)。

30

#### 【0261】

pembro反応性T細胞をさらに特徴付けるために、マスサイトメトリー(CyTOF)およびRNAシーケンシング(RNA-seq)を用いた。CyTOFのために、高次元の可視化および教師なしクラスタリングを用いた。PD-1はT<sub>EX</sub>細胞だけでなく、エフェクター、エフェクターメモリー、およびセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞でも発現されることが知られている(Bengsch, et al. PLoS Pathog. 2010, 6:e1000947; Duraiswamy, et al. J. Immunol. 2011, 186:4200-4212)。実際、メモリー(CCR7<sup>hi</sup>)およびエフェクター(CD27<sup>lo</sup>)の集団は、PD-1を発現するCD8<sup>+</sup>T細胞の中にある(図30A)。しかしながら、疲弊のマーカーを発現する第3の集団(たとえば、Eomes, CD39(Gupta et al. PLoS Pathog. 2015, 11:e1005177); 図28D、図30E、30F)も、抗PD-1処置後の頻度およびKi67発現の増加が同定された(図30B~30D)。この循環T<sub>EX</sub>細胞の集団は、抗PD-1療法の前後で、グランザイムBおよびパーフォリンの発現は低かったが、グランザイムAおよびKは高かった(図28E~28G)。全体のCD8<sup>+</sup>T細胞からのRNA-seqは、処理後に強く変化したいくつかの転写物を同定した(図31A、31B)。

40

50

## 【0262】

しかしながら、バルクCD8 T細胞においてKi67と同じパターンに従って変化した発現を有する遺伝子に焦点を合わせると、T<sub>EX</sub>細胞と一致する転写変化が明らかになった(図31C、31D、表1)。これらの分析により、CTLA4、HAVCR2(TIM-3をエンコード)、HLA-DRB1およびCD38の発現の増加、ならびに、増殖、代謝、CD28共刺激、およびJNKシグナル伝達を含む経路の変化が同定された。さらに、Ki67の上位50の正の遺伝子相関のセットは、以前にマウスにおけるLCMVシステムで得られたPD-1遮断によって再活性化されたT<sub>EX</sub>細胞のシグネチャについて高度に富化された(Pauken et al. Science 2016, 354:1160-1165、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)(図28H)。一緒に、これらのデータは、血中のT<sub>EX</sub>細胞表現型を有する循環集団を同定し、T<sub>EX</sub>細胞の再活性化と一致して、抗PD-1療法後のこの集団の変化を明らかにした。

10

## 【0263】

実施例7：pembro反応性T細胞のさらなるキャラクタリゼーションのためのマスマイトメトリー(CyTOF)およびRNAシーケンシング(RNA-seq)。

CyTOFのために、高次元の可視化および教師なしクラスタリングを用いた。PD-1はT<sub>EX</sub>細胞だけでなく、エフェクター、エフェクターメモリー、およびセントラルメモリーCD8 T細胞でも発現されることが知られている(Bengsch et al. PLoS Pathog. 2010, 6:e1000947; Duraiswamy et al. J. Immunol. 2011, 186:4200-4212)。実際に、メモリー(CCR7<sup>hi</sup>)およびエフェクター(CD27<sup>lo</sup>)集団は、PD-1を発現するCD8 T細胞の中にあった(図30A)。しかしながら、疲弊のマーカーを発現する第3の集団(たとえば、Eomes、CD39(Gupta et al. PLoS Pathog. 2015, 11:e1005177);図28D、図30E、30F)は、抗PD-1療法後に頻度およびKi67発現が増加されることも同定された(図30B~30D)。この循環T<sub>EX</sub>細胞の集団は、抗PD-1療法の前後で、グランザイムBおよびパーフォリンの発現は低かったが、グランザイムAおよびKは高かった(図28E~28G)。全CD8 T細胞からのRNA-seqは、処置後に強く変化したいくつかの転写産物を同定した(図31A、31B)。

20

## 【0264】

しかしながら、バルクCD8 T細胞においてKi67と同じパターンに従って変化した発現を有する遺伝子に焦点を合わせると、T<sub>EX</sub>細胞と一致する転写変化が明らかになった(図31C、31D、表1)。これらの分析は、CTLA4、HAVCR2(TIM-3をエンコード)、HLA-DRB1およびCD38の発現の増加、ならびに、増殖、代謝、CD28共刺激、およびJNKシグナル伝達を含む経路の変化を同定した。さらに、Ki67の上位50の正の遺伝子相関のセットは、以前にマウスにおけるLCMVシステムにおいて得られたPD-1遮断によって再活性化されたT<sub>EX</sub>細胞のシグネチャについて、高度に富化された(Pauken et al. Science 2016, 354:1160-1165)(図28H)。一緒に、これらのデータは、血中のT<sub>EX</sub>細胞表現型を有する循環集団を同定し、T<sub>EX</sub>細胞の再活性化と一致した、抗PD-1療法後のこの集団の変化を明らかにした。

30

## 【0265】

実施例8：応答性末梢血CD8 T細胞集団における腫瘍浸潤性T細胞クローンおよび血液Ki67<sup>+</sup>CD8 T細胞応答は、腫瘍負荷と相関する。

40

血液からの応答性T細胞クローンが腫瘍において見つかった。ネオ抗原 - および共有抗原 - 特異的T細胞の両方が、循環しているPD-1<sup>+</sup> CD8 T細胞集団において同定されている(Gros et al. Nat. Med. 2016, 22:433-438)。さらに、血液中のこれらの細胞と腫瘍浸潤性T細胞との間にクローンの重複がある(Gros et al. Nat. Med. 2016, 22:433-438)。抗PD-1療法後のこれらの関係を調査するために、3人のレスポンダーと3人の非レスポンダーからの処置後のKi67発現のピークで、血液からのCD8 T細胞を分類し、T細胞受容体(TCR)レパートリーを、前処理腫瘍浸潤T細胞と比較した。上位10の腫瘍浸潤性T細胞クローンの多くは、臨床応答に関係なく、すべてのケースにおいて頻度による2つの最も豊富なクローンを含め、血液中および処置後に容易に同定可能であった(図32A、32B、図33A、表2)。

50

## 【0266】

次に、これらの共有クローンが抗PD-1療法に应答する集団に存在するか否かを決定した。透過性を回避するため、Ki67ではなくHLA-DRおよびCD38 (Miller et al. Immunity 2008, 28: 710-722) の発現を用いて应答細胞をソートした。HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD8 T細胞の約80% (平均、80.1%) がKi67を発現し、これらのHLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>細胞はKi67<sup>+</sup> CD8 T細胞と同様の反応速度で应答した (図33B ~ 33D)。RNA-seqは、Ki67の上位50の相関関係の中でHLA-DRB1およびCD38を同定し (表1)、これらのHLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>細胞はT<sub>EX</sub>細胞のマーカーについて富化された (図33E、33F)。6人の患者にわたって、腫瘍および血液の両方で上位10クローンの中に14のクローンが存在した (図32B)。これらのすべて (14のうち14) は、血液中のHLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>であった (図32B)。上位100のクローンに拡張すると、血液および腫瘍の間で共有されている19クローンのうち18クローンがHLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>であったが、腫瘍ではなく血液でのみ見られるクローンでは、活性化表現型と休止表現型の混合が見つかった (図32C)。これらの観察結果は、血液中のKi67<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>) T<sub>EX</sub>細胞が抗PD-1療法によって活化され、腫瘍にも存在するT細胞クローンを含むという概念を支持する。

10

## 【0267】

T細胞の再活化は腫瘍負荷と相関することが示された。抗原負荷は、前臨床モデルにおけるPD-1療法によるT<sub>EX</sub>細胞の疲弊および再活化の重症度の重要な決定要因である (Blackburn et al. Nat. Immunol. 2009, 10: 29-37; Wherry et al. J. Virol. 2003, 77: 4911-4927)。メラノーマの患者でこのアイデアをテストするために、処置前のイメージングスキャンですべての測定可能な腫瘍病変を用いて抗原負荷を推定する実用的なアプローチを開発した (腫瘍負荷、実験例の材料および方法を参照)。実際、より高い腫瘍負荷は、治療前と治療後の両方で、より多くのKi67<sup>+</sup> CD8 T細胞と関連していた (図32D)。3週間での39の免疫パラメーターのランダムフォレストモデリングは、Ki67<sup>+</sup> CD8 T細胞が腫瘍負荷の最も強い相関であることを示した (図32E、表3)。この相関は処置前にも検出可能であったが、処置後には強くなり (図32F)、このことは、抗PD-1療法によって増強された腫瘍負荷に関連する既存のCD8 T細胞应答を示唆する。

20

## 【0268】

実施例9：腫瘍負荷に関連するCD8 T細胞再活化の追跡は、抗PD-1療法に対する应答を予測する。

30

本明細書では、再活化 / 腫瘍比が臨床成績に影響を与えることが示される。より大きなベースライン免疫应答が臨床应答と相関する可能性があった。しかしながら、PD-1<sup>+</sup> CD8 T細胞におけるより高い前処理Ki67レベルは、実際には予後不良の指標であった (図34A、上)。処置前のより大きな免疫应答は、それ自体が悪い予後指標である、より高い腫瘍負荷を反映し得る (図34A、下)。実際、抗PD-1療法で進行した患者は、ベースラインで全身性炎症の証拠があった (図34B、34C)。ランダムフォレスト分析では、Ki67単独は臨床結果と相関しないことを示した (データは示していない)。したがって、重要なのは再活化の絶対的な大きさではなく、腫瘍負荷に対するT<sub>EX</sub>細胞再活化の比率が臨床应答をよりよく予測し得るという仮説を立てた。これをテストするために、ベースラインの腫瘍負荷を調整した抗PD-1療法後のPD-1<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> CD8 T細胞の倍率変化に関する臨床应答を調べた。無増悪生存期間 (PFS) がより長い患者は、一般的に、腫瘍負荷が低く、PD-1<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> CD8 T細胞対腫瘍負荷回帰線の倍率変化の上でクラスター化しており、このことは、腫瘍負荷に対するT<sub>EX</sub>細胞再活化の比率が臨床成績に関連し得ることを示唆する (図35A)。さらに、処置前後の両方の測定を必要とする倍率変化の代わりに、処置後のピークT細胞应答時点での腫瘍負荷に対するKi67<sup>+</sup> CD8 T細胞のより高い比率は、より良い臨床成績と関連していた。レスポnderはPD-1<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup>細胞対腫瘍負担回帰線の上でクラスター化した。非レスポnderは大きく下回っていました (図35B)。分類および回帰ツリー (CART) 分析は、治療に入る6週間の早期に、臨床結果によって患者を分離する、1.94のKi67対腫瘍負荷比を同定した。6週間での1.94より大きいKi67対腫瘍負荷比は、客観的奏効率、PFS、および全生存率により良好な結果と関連していた (図3

40

50

4 D、図 3 5 C)。さらに、CyTOFにより、臨床的利益（完全応答、部分応答、および安定した疾患）を持つ3人の患者はT<sub>EX</sub>細胞の拡大を示したが、進行した患者はT<sub>EFF</sub>細胞の拡大を示し（図 3 0 G、3 0 H）、このことは、T<sub>EX</sub>細胞の再活化が重要であるというアイデアを支持する。

#### 【0269】

他の変数は、多変量回帰モデリング（図 3 5 D）によって検査され、BRAF阻害時の腫瘍浸潤リンパ球に関連し得るBRAF状態の追加の役割（Wilmott et al. Clin. Cancer Res. 2012, 18 : 1386-1394; Knight et al. J. Clin. Invest. 2013, 123 : 1371-1381）および乳酸デヒドロゲナーゼ、腫瘍負荷のための潜在的な循環プロキシ（図 3 5 E ~ 3 5 G）、およびステージIV黒色腫における既知の陰性予後指標（Balch et al. J. Clin. Oncol. 2009, 27 : 6199-6206）を示唆している。さらに、患者のサブセットからのデータは、公開された観察結果と一致する、腫瘍および変異負荷におけるPD-L1発現の役割も示唆している（Herbst et al. Nature 2014, 515 : 563-567; Tumei et al. Nature 2014, 515 : 568-571; Rizvi et al. Science 2015, 348 : 124-128）。したがって、このモデリングを拡張して他の変数を含めることは、将来的に重要になるであろう。

#### 【0270】

pembroで処置された進行性黒色腫の患者の第2の独立したコホートを分析した。フローサイトメトリーは、臨床試験NCT01295827に関与した患者のサブセットからのCD8 T細胞に対して行った（図 2 3）。このコホートからのデータにより、pembro処置後のPD-1<sup>+</sup>およびPD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>CD8 T細胞の優先的な再活化が確認された（図 3 4 E、3 4 F）。これらの分析はまた、1.94のKi67対腫瘍負荷比が、処置後6週間までの全生存と関連していたことも示した（図 3 4 G）。独立してリクルートおよび分析されたコホートにおけるこれらの重要な観察は、血中の再活化されたCD8 T細胞と全体的な腫瘍負荷との間の関係が臨床成績と相関するというアイデアを支持する。

#### 【0271】

本明細書に示されるのは、進行性黒色腫の患者におけるPD-1遮断に対する応答の理解に関連するいくつかの発見である。第一に、ほとんどの患者はCD8 T細胞に対するPD-1遮断の的確な免疫学的効果を有しており、この効果は末梢血において検出し、長期的に監視し、そして機能的に検査することができる。第二に、T<sub>EX</sub>細胞は黒色腫のほとんどの患者においてPD-1遮断の主要な標的として同定され、循環T<sub>EX</sub>細胞の変化を腫瘍負荷に関連付けることによって再活スコアを開発することができた。第三に、継続的な処置にもかかわらず、ほとんどの患者はPD-1遮断によって誘発される免疫の再活化の単一のピークを有する。第四に、血液中のこれらの応答するT<sub>EX</sub>細胞には、腫瘍浸潤性T細胞と共有されるTCRクロノタイプが含まれる。最後に、腫瘍負荷に対するT<sub>EX</sub>細胞再活化の比率は、臨床成績を区別し、応答を予測することができることが同定された。T<sub>EX</sub>細胞再活化と腫瘍負荷との間の関係は、抗原負荷に対する免疫応答のキャリブレーションを示唆し、腫瘍負荷が高い場合に抗PD-1療法による強力な再活化でさえ臨床的に効果がない可能性を高める。これらの観察に基づいて、予測された治療上の失敗のクラスを描くことが可能であり得る（図 3 6）。腫瘍負荷単独は、抗PD-1療法に対する応答の完全な予測因子ではなく、処置中の予測マーカーを規定することはチャレンジングである。処置中のバイオマーカーは、臨床反応をできるだけ早く規定する助けになる価値があるだけでなく、免疫学的不全のタイプを通知し、その後の治療を調整するのに価値がある。転移の解剖学的位置、PD-L1発現および変異表現型などの他のパラメーターが、T細胞再活化と腫瘍負荷との間のこの関係にさらなる分解能を付加する可能性がある。腫瘍負荷に基づいて、特定の患者におけるPD-1遮断によって誘発される再活化の量が不十分であり得ることを認識すると、たとえば追加の免疫療法または標的療法による早期臨床介入が可能になる（Sharma et al. Cell 2015, 161 : 205-214; Smyth et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2016, 13 : 143-158）。ここで報告されたアプローチが他の、特に免疫原性の低い腫瘍タイプに拡張できるか否かをテストすることが重要であろう。しかしながら、現在の研究は、PD-1遮断のオンターゲット薬力学的免疫効果および血液ベースの免疫モニタリングの有用性を示すだけでなく、

10

20

30

40

50

全体的な腫瘍負荷とPD-1遮断による免疫再活化の大きさとの間の関係を明らかにすることにより、潜在的な新規予測バイオマーカーおよび将来的な機構的な精査のフレームワークも同定する。

【 0 2 7 2 】

表

( 表 1 )

遺伝子	Corr	遺伝子	Corr	遺伝子	Corr
<i>MKI67</i>	1	<i>HLA.DRB1</i>	0.802198	<i>CD38</i>	0.747253
<i>CTLA4</i>	0.884615	<i>EPB41L4A</i>	0.801117	<i>RFC2</i>	0.74553
<i>HLA.DQB1</i>	0.884615	<i>FADS2</i>	0.79952	<i>ORMDL3</i>	0.741758
<i>CENPF</i>	0.873626	<i>CDCA7</i>	0.785127	<i>COL5A3</i>	0.740343
<i>RRM2</i>	0.855572	<i>HAVCR2</i>	0.78022	<i>TP53I11</i>	0.737277
<i>KIR3DX1</i>	0.851243	<i>LDLR</i>	0.769231	<i>HLA.K</i>	0.737277
<i>KIF19</i>	0.846154	<i>FBXO5</i>	0.763736	<i>LMNB1</i>	0.730769
<i>ARHGAP11A</i>	0.82967	<i>ITGAD</i>	0.760519	<i>PRKAR1B</i>	0.724521
<i>IFI6</i>	0.813187	<i>ALDOC</i>	0.758242	<i>CLSPN</i>	0.71978
<i>SYNGR1</i>	0.802198	<i>GAMT</i>	0.751393	<i>UBE2L6</i>	0.714286

10

20

遺伝子	Corr	遺伝子	Corr
<i>BPGM</i>	0.714286	<i>TRBV28</i>	-0.73077
<i>ANKS6</i>	-0.70426	<i>PPAN</i>	-0.73453
<i>FAM213B</i>	-0.70621	<i>PCDH1</i>	-0.73453
<i>TRIO</i>	-0.70702	<i>C9orf89</i>	-0.73829
<i>ZNF823</i>	-0.70799	<i>RP11.173A16.2</i>	-0.74003
<i>DKK3</i>	-0.71626	<i>CXXC5</i>	-0.74102
<i>ZNF605</i>	-0.72527	<i>RP11.213G2.3</i>	-0.74176
<i>VSIG1</i>	-0.72902	<i>GLTPD1</i>	-0.74176
<i>MAMLD1</i>	-0.72988	<i>IKZF2</i>	-0.74725
<i>DBN1</i>	-0.73077	<i>VCAN</i>	-0.75929

30

【 0 2 7 3 】

( 表 2 )

40

50



14784	ヌクレオチド	AA	PBMC Freq (%)	TIL Freq (%)
1	CCCCTGATCCTGGAGTCGCCCAG CCCCAACCAGACCTCTCTGTACT TCTGTGCCAGCAGTTCCTATTAC GAGCAGTACTTCGGGCCG (SEQ ID NO: 35)	CASSSYEQYF (SEQ ID NO: 65)	8.04	0.31
2	AGTGCCCATCCTGAAGACAGCAG CTTCTACATCTGCAGTGCTAGGA GCACCGGGACTATGATTCGGGCT GAGCAGTTCTTCGGGCCA (SEQ ID NO: 36)	CSARSTGMTIRAEQFF (SEQ ID NO: 66)	1.45	0.27
3	CTGACTGTGAGCAACATGAGCCC TGAAGACAGCAGCATATATCTCT GCAGCGTCCAAGGGGGATCTCT GAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 37)	CSVQGSPEAFF (SEQ ID NO: 67)	1.38	0.22
4	CTAAACCTGAGCTCTCTGGAGCT GGGGGACTCAGCTTTGTATTCT GTGCCAGCAGCGTGTAGGGGAT GAGCAGTTCTTCGGGCCA (SEQ ID NO: 38)	CASSVLGDEQFF (SEQ ID NO: 68)	0.8	0.64
5	CTGAATGTGAACGCCTTGTGCT GGGGGACTCGGCCCTCTATCTCT GTGCCAGCAGCTTtaggtccggg GAGCTGTTTTTTGGAGAA (SEQ ID NO: 39)	CASSFRSGELFF (SEQ ID NO: 69)	0.43	0.25
6	CTGCTGGGGTTGGAGTCGGCTGC TCCCTCCCAAACATCTGTGTACTT CTGTGCCAGCCGGCAGGGTTTTG GCTACACCTTCGGTTCG (SEQ ID NO: 40)	CASRQGFYTF (SEQ ID NO: 70)	0.14	1.35
7	ACTCTGACGATCCAGCGCACACA GCAGGAGGACTCGGCCGTGTATC TCTGTGCCAGCAGCTTAGGGTAC ACCATATATTTTGGAGAG (SEQ ID NO: 41)	CASSLGYTIYF (SEQ ID NO: 71)	0.03	1.56
8	CACGCCCTGCAGCCAGAAGACTC AGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCA GCCAAGTGCCTAGCGGCCCTAC GAGCAGTACTTCGGGCCG (SEQ ID NO: 42)	CASSQVPSGPYEQYF (SEQ ID NO: 72)	0.03	0.82
9	ACCAGTGCCCATCCTGAAGACAG CAGCTTCTACATCTGCAGTGCTC CGGGGATCGGGCGACGGGGGAC TGAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 43)	CSAPGIGRRGTEAFF (SEQ ID NO: 73)	0	0.27
10	GCTGCTCCCTCCCAGACATCTGT GTACTTCTGTGCCAGCAGTCTAA CAGGGGTGGTCATATACACCGGG GAGCTGTTTTTTGGAGAA (SEQ ID NO: 44)	CASLTGVVIYTGELFF (SEQ ID NO: 74)	0	0.27
12288	ヌクレオチド	AA	PBMC	TIL Freq

10

20

30

40

50

			Freq (%)	(%)
1	CTGAAGATCCAGCCCTCAGAACC CAGGGACTCAGCTGTGTACTTCT GTGCCAGCAGTCCCTTGGGCTAC GAGCAGTACTTCGGGCGG (SEQ ID NO: 45)	CASSPLGYEQYF (SEQ ID NO: 75)	2.37	0.42
2	AGCACCTTGGAGCTGGGGGACTC GGCCCTTTATCTTTGCGCCAGCA GCGGGGGACAGGCCAGCTCCTAC GAGCAGTACTTCGGGCGG (SEQ ID NO: 46)	CASSGGQASSYEQYF (SEQ ID NO: 76)	0.3	0.58
3	ATCCGGTCCACAAAGCTGGAGGA CTCAGCCATGTACTTCTGTGCCA GCAGAGGACAAGACCAGAACAC TGAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 47)	CASRGQDQNTAEFF (SEQ ID NO: 77)	0.24	0.89
4	CTCAGGCTGGAGTCGGCTGCTCC CTCCCAGACATCTGTGTACTTCTG TGCCAGCAGTGAACAGACACTG AAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 48)	CASSETDTEAFF (SEQ ID NO: 78)	0.04	0.51
5	CACCTACACACCCTGCAGCCAGA AGACTCGGCCCTGTATCTCTGCG CCAGCAGCCAAATCGGGGATAA GACGGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 49)	CASSQIGDKTAEFF (SEQ ID NO: 79)	0.02	
6	AAGATCCAGCCTGCAGAGCTTGG GGACTCGGCCGTGTATCTCTGTG CCAGCAGCCATAAACACCGGG GAGCTGTTTTTTGGAGAA (SEQ ID NO: 50)	CASSHTNTGELFF (SEQ ID NO: 80)	0.01	0.57
7	TTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCCA AACATCTGTGTACTTCTGTGCCA GCAGTTACGGGGGACAGGGGCT GAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 51)	CASSYGGQGPEAFF (SEQ ID NO: 81)	0.01	0.44
8	GAGATCCAGCGCACAGAGCAGG GGGACTCGGCCATGTATCTCTGT GCCAGCAGTCTAGTCGGGGGGAG GGAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 52)	CASSLVGGREAFF (SEQ ID NO: 82)	0	1.3
14835	ヌクレオチド	AA	PBMC Freq (%)	TIL Freq (%)
1	CACGCCCTGCAGCCAGAAGACTC AGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCA GCCTGGACAGGGGGTATAATCAG CCCCAGCATTTTGGTGAT (SEQ ID NO: 53)	CASSLDRGYNQPQHF (SEQ ID NO: 83)	23.03	1.09
2	CAACCTGCAAAGCTTGAGGACTC GGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCA GCTTCAATGGGGAGATGAACACT GAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 54)	CASSFNGEMNTEAFF (SEQ ID NO: 84)	0.01	1.36
13416	ヌクレオチド	AA	PBMC Freq (%)	TIL Freq (%)

10

20

30

40

50

1	TTGGAGATCCAGCGCACAGAGCA GGGGGACTCGGCCATGTATCTCT GTGCCAGCAGCCTTTCCTCTTCAC CCCTCCACTTTGGGAAC (SEQ ID NO: 55)	CASSLSSSPLHF (SEQ ID NO: 85)	15.16	1.42
2	TCTAAGAAGCTCCTCCTCAGTGA CTCTGGCTTCTATCTCTGTGCCTT CGTCAGCAGGGGAGGCGACTATG GCTACACCTTCGGTTCG (SEQ ID NO: 56)	CAFVSRGGDYGYTF (SEQ ID NO: 86)	14.59	0.65
3	CTGAGCTCTCTGGAGCTGGGGGA CTCAGCTTTGTATTTCTGTGCCAG CAGCGCTCCGCGTGGGCCGCTG AAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 57)	CASSASAWAAEAFF (SEQ ID NO: 87)	7.38	1.34
4	ATGAGCTCCTTGGAGCTGGGGGA CTCAGCCCTGTACTTCTGTGCCA GCAGCTCGAGGACTAGGTGGAAT GAGCAGTTCTTCGGGCCA (SEQ ID NO: 58)	CASSSRTRWNEQFF (SEQ ID NO: 88)	6.73	0.78
5	CTGAAGATCCAGCCCTCAGAACC CAGGGACTCAGCTGTGTACTTCT GTGCCAGCAGCAGTGCTAACTAT GGCTACACCTTCGGTTCG (SEQ ID NO: 59)	CASSSANYGYTF (SEQ ID NO: 89)	2.26	1.94
6	GAAGTGAACATGAGCTCCTTGA GCTGGGGGACTCAGCCCTGTACT TCTGTGCCAGCAGTTCATCTGAT ACGCAGTATTTTGGCCCA (SEQ ID NO: 60)	CASSSDTQYF (SEQ ID NO: 90)	0	0.82
13471	ヌクレオチド	AA	PBMC Freq (%)	TIL Freq (%)
1	TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGC TTTGTATTTCTGTGCCAGCAGCGT AGGGGACAGGGGGTCTGGAAAC ACCATATATTTTGGAGAG (SEQ ID NO: 61)	CASSVGDGRSGNTIYF (SEQ ID NO: 91)	5.8	0.6
2	TCCGCTACCAGCTCCAGACATC TGTGTACTTCTGTGCCATCAGTG ACCTCGGCGGCCCGGCCGCAGAT ACGCAGTATTTTGGCCCA (SEQ ID NO: 62)	CAISDLGGPAADTQYF (SEQ ID NO: 92)	0.84	0.29
14746	ヌクレオチド	AA	PBMC Freq (%)	TIL Freq (%)
1	CCCAGCCCCAACAGACCTCTCT GTACTTCTGTGCCAGCAGTTTAT GGGGCGGCGGGAGCTCCTACAAT GAGCAGTTCTTCGGGCCA (SEQ ID NO: 63)	CASSLWGGGSSYNEQFF (SEQ ID NO: 93)	9.96	3.54
2	CAGCCTGCAGAACTGGAGGATTC TGGAGTTTATTTCTGTGCCAGCA GCCAACTGACAGGGGCTGACACT GAAGCTTTCTTTGGACAA (SEQ ID NO: 64)	CASSQLTGADTEAFF (SEQ ID NO: 94)	0.4	0.59

【 0 2 7 4 】

( 表 3 )

10

20

30

40

50

## Pre – 腫瘍負荷

ランク	免疫サブセット	Z
1	CD8/Lag3+   Freq. of Parent (%)	5.55
2	CD8/Ki67+   Freq. of Parent (%)	3.46
3	CD4   Freq. of Parent (%)	5.66
4	CD4/Non-Tregs/Q4: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	4.74
5	CD4/Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	3.85
6	CD8   Freq. of Parent (%)	2.96
7	CD4/Non-Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	2.57
8	CD4/Non-Tregs/Q1: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	0.76
9	CD8/Eomes+   Freq. of Parent (%)	0.51
10	CD8/Tim3+   Freq. of Parent (%)	0.44
11	CD8/naive   Freq. of Parent (%)	0.22
12	CD4/Non-Tregs/Q3: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	0.19
13	CD4/Non-Tregs/Q2: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	-0.04
14	CD8/Q23: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-0.23
15	CD4/Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	-0.54
16	CD8/PD1+   Freq. of Parent (%)	-0.61
17	CD8/Q24: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	-0.66
18	CD4/Non-Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-1.24
19	CD8/Q21: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-1.38
20	CD8/Q22: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	-1.81
21	CD4/Non-Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-1.83
22	CD8/CD133+   Freq. of Parent (%)	-2.09
23	CD4/Non-Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	-2.15
24	CD4/Tregs/naive   Freq. of Parent (%)	-2.16
25	CD4/Non-Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-2.19
26	CD4/Non-Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-2.93
27	CD4/Tregs   Freq. of Parent (%)	-3.09
28	CD8/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-3.30
29	CD4/Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-3.73
30	CD4/Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-3.96
31	CD4/Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-4.01
32	CD4/Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-4.05
33	CD8/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-4.75
34	CD8/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-4.82
35	CD4/Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-4.82
36	CD4/Non-Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-7.01
37	CD4/Non-Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-7.48
38	CD4/Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-7.61
39	CD4/Non-Tregs   Freq. of Parent (%)	-7.85

## Wk3 – 腫瘍負荷

ランク	免疫サブセット	Z
1	CD8/Ki67+   Freq. of Parent (%)	32.47
2	CD4/Non-Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	17.58
3	CD8/Lag3+   Freq. of Parent (%)	13.41
4	CD4/Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	11.47
5	CD8/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	8.04
6	CD4/Non-Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	6.75
7	CD4/Non-Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	5.92
8	CD4/Non-Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	2.74
9	CD8/PD1+   Freq. of Parent (%)	2.24
10	CD8/Tim3+   Freq. of Parent (%)	1.79
11	CD8/Eomes+   Freq. of Parent (%)	0.95
12	CD4/Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	0.42
13	CD8/naive   Freq. of Parent (%)	0.24
14	CD4/Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	0.23
15	CD4   Freq. of Parent (%)	0.23
16	CD8/Q21: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-0.51
17	CD8/Q22: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-0.87
18	CD4/Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-0.71
19	CD8/Q24: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	-0.74
20	CD4/Tregs/naive   Freq. of Parent (%)	-1.01
21	CD4/Non-Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-1.10
22	CD4/Non-Tregs/Q2: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-1.15
23	CD4/Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-1.35
24	CD4/Non-Tregs/Q3: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	-1.36
25	CD8/CD133+   Freq. of Parent (%)	-1.53
26	CD4/Non-Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-1.99
27	CD8/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-2.06
28	CD8   Freq. of Parent (%)	-2.19
29	CD4/Non-Tregs/Q4: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	-2.19
30	CD4/Non-Tregs   Freq. of Parent (%)	-2.25
31	CD4/Tregs   Freq. of Parent (%)	-2.26
32	CD8/Q23: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-2.35
33	CD4/Non-Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-2.43
34	CD4/Non-Tregs/Q1: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-2.72
35	CD4/Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-2.84
36	CD4/Non-Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-3.27
37	CD4/Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-3.36
38	CD8/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-3.83
39	CD4/Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-5.76

10

20

30

40

50

## Pre – PFS

ランク	免疫サブセット	%
1	CD8/CD163+   Freq. of Parent (%)	30.75
2	CD8/Ki67+   Freq. of Parent (%)	14.48
3	CD4/Non-Tregs/Q3: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	11.54
4	CD8/Lag3+   Freq. of Parent (%)	7.50
5	CD4/Non-Tregs/Q4: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	3.66
6	CD4/Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	3.53
7	CD4/Non-Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	3.15
8	CD8/Tbet+   Freq. of Parent (%)	2.71
9	CD8/GzmB+   Freq. of Parent (%)	2.64
10	CD4/Non-Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	1.63
11	CD4/Non-Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	1.23
12	CD8/Q23: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	0.70
13	CD4/Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	0.47
14	CD8/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	0.22
15	CD8/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-0.35
16	CD4/Non-Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-0.49
17	CD4   Freq. of Parent (%)	-0.66
18	CD4/Non-Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-1.02
19	CD4/Non-Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-1.58
20	CD8   Freq. of Parent (%)	-1.61
21	CD4/Non-Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	-1.81
22	CD4/Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-1.82
23	CD8/Q23: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-2.14
24	CD4/Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-2.50
25	CD4/Non-Tregs   Freq. of Parent (%)	-2.98
26	CD4/Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-3.09
27	CD8/naive   Freq. of Parent (%)	-3.28
28	CD8/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-3.80
29	CD8/Q24: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	-3.61
30	CD4/Tregs/naive   Freq. of Parent (%)	-3.81
31	CD8/Q21: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-3.95
32	CD4/Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-3.99
33	CD4/Non-Tregs/Q1: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-4.30
34	CD8/PD1+   Freq. of Parent (%)	-4.20
35	CD4/Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-4.65
36	CD4/Tregs   Freq. of Parent (%)	-5.33
37	CD4/Non-Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-5.20
38	CD4/Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-5.83
39	CD4/Non-Tregs/Q2: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	-6.81

## Wk3 – PFS

ランク	免疫サブセット	%
1	CD4/Non-Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	18.32
2	CD4/Tregs/Tbet+   Freq. of Parent (%)	16.31
3	CD4/Non-Tregs/Q3: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	12.41
4	CD8/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	10.32
5	CD4/Non-Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	0.45
6	CD4/Tregs   Freq. of Parent (%)	3.49
7	CD8/GzmB+   Freq. of Parent (%)	2.84
8	CD8   Freq. of Parent (%)	2.38
9	CD8/PD1+   Freq. of Parent (%)	1.54
10	CD4/Non-Tregs   Freq. of Parent (%)	1.51
11	CD8/Q2+ : CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	1.34
12	CD8/Tim3+   Freq. of Parent (%)	1.16
13	CD4/Non-Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	0.88
14	CD8/Eomes+   Freq. of Parent (%)	0.86
15	CD4   Freq. of Parent (%)	0.56
16	CD4/Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	0.36
17	CD4/Tregs/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-0.32
18	CD4/Tregs/Eomes+   Freq. of Parent (%)	-0.48
19	CD8/Q23: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-0.83
20	CD4/Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-0.91
21	CD4/Non-Tregs/PD1+   Freq. of Parent (%)	-0.92
22	CD4/Non-Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-1.06
23	CD8/CD163+   Freq. of Parent (%)	-1.58
24	CD4/Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-1.74
25	CD4/Non-Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-2.05
26	CD4/Non-Tregs/Tim3+   Freq. of Parent (%)	-2.25
27	CD4/Tregs/naive   Freq. of Parent (%)	-2.42
28	CD4/Non-Tregs/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-2.67
29	CD8/Tbet+   Freq. of Parent (%)	-2.68
30	CD4/Non-Tregs/Q2: CD45RA+ , CD27+   Freq. of Parent (%)	-2.75
31	CD4/Non-Tregs/Q1: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-2.86
32	CD4/Tregs/CTLA4+   Freq. of Parent (%)	-2.96
33	CD4/Non-Tregs/Q4: CD45RA- , CD27-   Freq. of Parent (%)	-3.02
34	CD4/Tregs/GzmB+   Freq. of Parent (%)	-3.12
35	CD8/Q23: CD45RA+ , CD27-   Freq. of Parent (%)	-3.12
36	CD8/Q21: CD45RA- , CD27+   Freq. of Parent (%)	-4.06
37	CD8/naive   Freq. of Parent (%)	-4.57
38	CD8/Ki67+   Freq. of Parent (%)	-5.08
39	CD8/Lag3+   Freq. of Parent (%)	-5.30

【 0 2 7 5 】

実施例 10 : T<sub>EX</sub>におけるユニークな発現パターンを有する遺伝子の同定。

疲弊したCD8 T細胞 (T<sub>EX</sub>) は、それらをナイーブ (T<sub>N</sub>)、エフェクター (T<sub>EFF</sub>) およびメモリー (T<sub>MEM</sub>) T細胞から区別する主要な転写の変化を引き起こす (図 37A) (Wherry and Kurachi, Nat Rev Immunol. 2015, 15(8):486-499)。癌モデルにおける同様の発症を伴い (Philip et al. (2017) Nature 545 : 452-456; Schietinger et al. (2016) Immunity 45 : 389-401)、慢性感染の約2週間後の慢性LCMV感染中に (Angelosanto et al. (2012) J Virol 86 : 8161-8170; Doering et al. (2012) Im-

munology 37 : 1130-1144)、疲弊の機能的および転写的特徴が発生する。本研究では、慢性LCMV感染時にT<sub>EX</sub>において特に調節される遺伝子のコアシグネチャは、他の設定でT<sub>EX</sub>を同定および監視するために用いることができることが同定された。我々および他の人々 (Doering et al. (2012) Immunity 37:1130-1144; Singer et al. (2016) Cell 166:1500-1511, e1509; Wherry et al. (2007) Immunity 27:670-684) は疲弊の転写シグネチャを以前に報告しているが、ここでの我々の目標とアプローチは明確であった。我々は、高度にT<sub>EX</sub>バイアスされた遺伝子のフォーカスされたセットを同定し、このシグネチャを他の疲弊の設定からの幅広いシグネチャに対して検証し、そして次に、個々の遺伝子のエピジェネティック情報を用いてシグネチャをさらに精密にし、これらのシグネチャをバルクRNAおよびエピジェネティックデータからヒトT<sub>EX</sub>の生物学を調べるため

10

20

30

40

50

の単一細胞法に変換するマスサイトメトリープラットフォームの開発を可能にすることを目的とした。

#### 【0276】

したがって、急性分解LCMVアームストロング (Armstrong) 感染における $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、および $T_{MEM}$ と比較して、慢性LCMV感染時のウイルス特異的 $T_{EX}$ において特異的に上方または下方制御される遺伝子を同定した (図37A、37B)。 $T_{EFF}$ に見られる活性化関連遺伝子と比較して、 $T_{EX}$ に高度に偏った遺伝子に焦点が当てられた。たとえば、Tim-3をコードするHavcr1は、 $T_{EX}$ と比較して $T_{EFF}$ においてより高度に発現され、これにより、 $T_{EFF}$ と比較して $T_{EX}$ においてより高いCD38とは対照的に、含まれなかった。遺伝子の選択は、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Subramanian et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15545-15550) によって検証し、クローン13の感染後30dに単離された $T_{EX}$ を $T_{MEM}$ 、 $T_{EFF}$ および $T_N$ と比較した (図37C)。このシグネチャが $T_{EX}$ のサブセットにおいて富化するか否かも調査した (Blackburn et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15016-15021; Im et al. (2016) *Nature* 537:417-421; Paley et al. (2012) *Science* 338:1220-1225)。GSEAは、低レベルのPD-1を発現する $T_{EX}$ の前駆サブセットと比較して、高レベルのPD-1を発現するより終末に疲弊した $T_{EX}$ サブセットのシグネチャにおいて強い富化を示した (図37D)。CXCR5 +  $T_{EX}$ と比較したTim-3 +の分析は、より終末のTim-3 +サブセットにおいて同様の富化を示し (図37D)、 $T_{EX}$ のPD-1<sup>hi</sup>およびTim-3 +サブセットにおける重度の疲弊の報告 (Blackburn et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15016-15021; Im et al. (2016) *Nature* 537:417-421) と一致した。しかしながら、その選択された遺伝子は、これらの細胞を終末の $T_{EX}$ ではなく $T_{EFF}$ と比較した場合に $T_{EX}$ のより終末のサブセットにおいても富化され、このことは、このシグネチャの高感度を示唆する。さらに、この $T_{EX}$ シグネチャは、メラノーマ患者対末梢血からの腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) において、および、HIV進行患者対エリートコントローラーからのHIV特異的T細胞において、強力に富化され (図37E)、以前のレポート (Baitsch et al. (2011) *J Clin Invest* 121:2350-2360) と一致した。多くの疲弊遺伝子がエリートコントローラーにおいて富化され、これは、そのシグネチャがより少ない機能不全の疲労状態を識別するのに役立ち得る遺伝子も含むことを示す (図37E)。これらの分析を他のトランスクリプトームデータセットに拡張すると、CD39 + HCV特異的CD8 T細胞などのインシリコでより疲弊したヒトT細胞集団も同定された (Gupta et al., 2015) (図37F)。リーディングエッジは、黒色腫および慢性HCV感染からのTILの富化に共通していた、ENTPD1 (CD39をエンコード)、CTLA4、PDCD1、およびCD38を含む、富化に強く寄与する遺伝子を同定した (図37G、37H)。要約すると、これらの分析は、種および病気の種類間で共有された慢性LCMV感染における $T_{EX}$ のトランスクリプトームのシグネチャを同定した。さらに、富化のパターンは、このシグネチャの要素が、異なる人間の病気における疲弊のさまざまな特徴を区別することができる可能性があることを示唆する。

#### 【0277】

実施例11：エピジェネティックな変化により同定されたユニークに調節された $T_{EX}$ 遺伝子。

エピゲノムのリモデリングは、細胞の運命の決定の根底にあり、しばしば系統特異的な様式で遺伝子発現の安定性を制御する (Nashun et al. (2015) *EMBO J* 34:1296-1308)。したがって、エピジェネティックなパターンは、遺伝子発現よりも細胞同一性のより忠実な指標であり得る。たとえば、Th1およびTh2細胞では、T-betまたはGATA3は遺伝的に除去され得るが、これらのCD4 T細胞は、Th1およびTh2同一性の主要なエピジェネティックな特徴を保持する (Vahedi et al. (2012) *Cell* 151:981-993)。今日まで、トランスクリプトームのおよびエピジェネティックな変化を同時統合する $T_{EX}$ のシグネチャは開発されていない。理論に拘束されるつもりはないが、1つの仮説は、 $T_{EX}$ 特異的なエピジェネティックな変化 (すなわち、オープンクロマチン領域 (OCR: エンハンサーなど) におけるもの) も示す $T_{EX}$ においてユニークにアップレギュレートまたはダウ

ンレギュレートされる遺伝子が、疲弊のより強力かつ安定なシグネチャを供し得るということである。この仮説をテストするために、エンハンサーを、GSE86797およびGSE87646データセット (Pauken et al. Science 2016, 354(6316):1160-1165; Sen et al. Science 2016, 354(6316):1165-1169) におけるハイスループットシーケンシング (ATAC-Seq) でのAssay for Transposase-Accessible Chromatinによるエピゲノムプロファイリングを用いて、 $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、 $T_{MEM}$ と比較して慢性LCMV感染から $T_{EX}$ において同定した。

#### 【0278】

図37において同定された示差的に発現された遺伝子から始めて、313の上方制御および182の下方制御された疲弊特異的遺伝子には、関連する $T_{EX}$ 関連のエピジェネティックな (エンハンサーなど) 変化も含まれていた (図38A、38B)。これらの遺伝子には、IR (Pdc1、Tigit、Ctla4など)、代謝調節に関与するエクトエンザイム (Cd38、Entpd1など)、ケモカインおよびサイトカイン (Xcl1など)、ならびに転写因子 (Eomes、Ikzf2、Toxなど) をコードする遺伝子に近い、よりアクセスしやすいOCRを持つものが含まれる (図38B)。 $T_{EX}$ においてダウンレギュレートされた発現にリンクされたOCRのアクセシビリティが低下した遺伝子 (Ccr7、Il7r、Nt5e、Tcf7、Lef1など) も同定した。関連するOCRの変化を伴う $T_{EX}$ 遺伝子は、 $T_{EX}$ 関連のエピジェネティックな変化のない遺伝子と比較して、図37における疾患全体の $T_{EX}$ 集団の比較において観察された富化に、有意により頻繁に寄与した。この特徴は、GSEAリーディングエッジ寄与が有意に高いことによって明らかになった (図38C、38D、38E)。GOターム分析は、これらの「エピゲノム的に選択された」上方制御された疲弊遺伝子が免疫活性化およびリン酸化経路の調節において富化されたのに対し、下方制御された遺伝子は、 $T_{EX}$ の既知の生物学に沿って、代謝プロセスについて富化された (図38F)。これらのデータは、 $T_{EX}$ を正規のT細胞サブセットと区別する主要な遺伝子が、ユニークなトランスクリプトーム発現パターンおよび関連するエピジェネティックな変化の組み合わせによって明らかになることを示す。したがって、これらのユニークに調節された遺伝子は、多様な疾患タイプにわたる疲弊のバイオマーカーの強力な候補である。

#### 【0279】

実施例12：疲弊遺伝子を発現するCD8 T細胞は、HIV疾患の進行のバイオマーカーである。

$T_{EX}$ は慢性HIV感染のハロマークであり、CD4/CD8比が低下してウイルス負荷が上昇した場合に進行したHIV疾患において重度の疲弊が報告されている (Buggert et al. (2014) J Immunol 192:2099-2108; Hoffmann et al. (2016) PLoS Pathog 12, e1005661; Serrano-Villar et al. (2014) PLoS Pathog 10, e1004078)。理論に縛られることを望まないが、仮説は、上記で規定された集団ベースのエピゲノムの疲弊シグネチャを単一細胞プロファイリングアプローチに変換すると、HIV疾患における $T_{EX}$ の多様性に対する洞察を提供できるというものである。これにより、マスサイトメトリーパネルは、系統および他の分化状態を規定するための他のT細胞マーカーと一緒に16+エピゲノム的に選択された疲弊関連遺伝子を統合するように構築された。CyTOFによるさらなる分析のために選択された遺伝子は、サイトメトリー分析のための高品質の抗体の入手可能性に部分的に基づいて選択された。とりわけ、ADAM19、BHLHE41、DUSP4、GLP1R、GPR65、GPR155、IFI27、IFI44、PRDM1、PTPN13、RGS16、SLC22A15を含む、その他の潜在的に興味深いエピゲノム的に選択された遺伝子もさらなる分析のために利用できる。このCyTOFパネルのために選択されたタンパク質をコードする疲弊遺伝子は、さまざまな疾患での疲弊シグネチャの富化に対する高いリーディングエッジ寄与を有しており、このことは、この遺伝子のサブセットでさえ、疲弊の主要な特徴を象徴していることを示す (図39A、39B)。これらの選択された遺伝子/タンパク質が単一細胞データセットにおいて差別的な可能性を有するか否かを調査するため、およびCyTOFパネルのために選択された16  $T_{EX}$  標的をより大きなエピゲノム的に選択されたリストと比較するため、ヒト黒色腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) からの近年公開されたCD8 T細胞単一細胞トランスクリ

ブトームデータセットのGene Set Variation Analysis (GSVA) を用いた (Tirosh et al. (2016) Science 352:189-196)。これらの分析は、a) すべてのエピゲノム的に選択された遺伝子とCyTOF選択された遺伝子セットとの両方が、さまざまな患者からのサンプルに対応するscRNA-seqデータにおけるかなりの変動を識別すること、b) CyTOF分析のために選択された遺伝子はより大きなエピゲノム的に選択された遺伝子リストに類似する識別能力を有することを示した (図44)。

#### 【0280】

このCyTOFパネルを、健康な対照の対象および活動性のHIV感染患者のコホート、ならびに抗レトロウイルス療法 (ART) を受けているHIV患者からのPBMCの分析に適用した。後の分析では、巨視的に関与していない肺組織からのPBMC細胞および肺腫瘍のTILを含む、肺癌患者からのサンプルを含めた。古典的に規定された $T_N$ 、 $T_{EFF}$ 、エフェクターメモリー ( $T_{EM}$ )、セントラルメモリー ( $T_{CM}$ )、および最終分化したエフェクターメモリー RA ( $T_{EMRA}$ ) のCD8 T細胞集団、ならびに、PD-1 + CD8 T細胞を、CyTOFパネルにおけるエピゲノム的に選択された疲弊マーカーの発現について検査した (図39C、39D)。PD-1+細胞は他のフェノタイプで規定されたCD8 T細胞集団のいずれよりも多くの $T_{EX}$ マーカーを発現したが、 $T_N$ および $T_{CM}$ は $T_{EX}$ によってダウンレギュレートされた分子を発現した (図39C)。

#### 【0281】

個々の疲弊分子の発現とCD4/CD8比との相関を、免疫調節不全および進行性HIV疾患の確立された測定基準として検査した (図39D)。 $T_{EX}$ において低下すると予測された分子は、健康、軽度の疾患、およびより高いCD4/CD8比と相関した (CCR7、CD73、CD127など) が、 $T_{EX}$ において上昇すると予測された分子は、進行した疾患を示す低いCD4/CD8比と相関した (たとえば、2B4、CD38、CD39、Eomes、PD-1、TIGIT、TOX) (図39D; 図45)。相関行列分析は、PD-1、Eomes、2B4、TIGIT、およびCD38など、HIVにおいて高度に共調節される疲弊関連分子のセットを同定した (図39E、図46)。これらの分子のいくつか (すなわち、CD38およびPD-1) は、進行中のHIV感染における免疫活性化および/または疲弊の既知の指標である (Cockerham et al. (2014) AIDS 28:1749-1758)。しかしながら、疲弊においてアップレギュレートされると予測された一部のマーカーは、重症のHIVにおいて富化に向かう傾向を示すのみである (LAG-3、CTLA-4) か、または、重症度の低い疾患に関連するだけであり (CD7、Helios)、このことは、重度のHIV感染における疲弊が、単一マーカーの分析により十分に捕捉されなかったより複雑な単一細胞表現型に関連することを示唆する。実際、HIV-AIDSまたは肺癌を患う個々の患者では、たとえばCD7およびPD-1の同時発現によって同定された、より極端な $T_{EX}$ 表現型が存在した (図39F)。さらに、健康な対象においてPD-1との明らかな、陰性 (CTLA-4、LAG-3、CD39) または複雑な (Helios) 共発現パターンを示さなかった他の分子は、疾患においてPD-1とポジティブに関連するようになり、これは、 $T_{EX}$ の高次元分析の必要性を示す。

#### 【0282】

実施例13：疲弊の高次元単一細胞マップは、 $T_{EX}$ ランドスケープにおいてウイルス特異的T細胞およびTILの異なる位置を明らかにする。

このCyTOFパネルによって規定された複雑な $T_{EX}$ 表現型を視覚化するため、最初に、tSNEベースの次元削減アプローチを、CyTOFによって分析された疲弊マーカーからの情報を統合するために用いた。非ナイーブCD8 T細胞の高次元疲弊データを「疲弊マップ」に表示した (図40A)。マップの隣接領域に局在する、密接に関連する高次元表現型を持つ細胞 (図40B)。たとえば、PD-1の発現は、Eomes、複数の他のIR、およびCD127発現の不足と大きく重なった (図40B)。Eomesおよび他のIRを欠如するPD-1+細胞のより小さな領域も明らかで、おそらく活性化依存のPD-1発現を反映する。他の領域では、他の $T_{EX}$ 遺伝子 (CD38、CD39、Helios、TOXなど) の発現が異なるパターンで共発現していた (図40B)。この疲弊マップは、患者と疾患全体の疲弊状態の違いを調べるために用いた (図40C)。真正のウイルス特異的CD8 T細胞集団がこのランドスケープで



マップされた場所を最初に調べた。CMVおよびインフルエンザウイルス（FLU）エピトープをターゲットとするウイルス特異的CD8 T細胞は、HIV特異的CD8 T細胞と比較して疲弊マップの異なる領域に配置され、このことは、ウイルス特異的CD8 T細胞の既知の分化パターンを区別するこのアプローチの能力を確認する（図40D）（Appay et al.（2008）Cytometry A 73：975-983）。さらに、HIV特異的CD8 T細胞は、FLU特異的およびいくつかのCMV特異的集団ではそうではないが、疲弊マップのPD-1+部分と重複した（図40B、40D）。したがって、ウイルス特異的CD8 T細胞の検査により、HIV、CMV、およびFLU特異的集団を区別する能力における疲弊マップが検証された。

#### 【0283】

健康な対象ならびに治療を受けているおよび治療を受けていないHIV患者からのすべてのナイーブCD8 T細胞を検査した。図40Eに示されている連結データは、これらのコホートにおけるT細胞集団の異なる分布を明らかにし、疾患状態を分析するための「疲弊フィンガープリント」を用いる可能性を示す。T<sub>EX</sub>はウイルス感染症および癌において報告されているが、さまざまな疾患においてT<sub>EX</sub>の異なる特徴に対する共通の特徴があるか否かは不明なままである。この問題に対処するために、肺癌患者から分離されたTIL、および同じ肺の巨視的に影響を受けていない隣接組織から単離されたT細胞を検査した（図40F）。HIV特異的T細胞と一部重複する領域にマップされたTILは、しかし、HIV T<sub>EX</sub>と異なる特徴も示した（図40F）。しかしながら、肺組織の微小環境は、肺癌TILのシグネチャに寄与し得る。実際、関与していない肺組織からの細胞の表現型シグネチャの除去の後、TILのいくつかの特徴は、PD-1、他のIRおよびEomesの強力な共発現が存在するHIV特異的CD8 T細胞と部分的に重複した（たとえば、疲弊マップ（図40B、40F、40G）のトップ）が、他の特徴は、T<sub>EX</sub>ランドスケープの他の領域に局在化した強力なPD-1およびCD39同時発現のようなTILにおいて高度に富化された（図40F、40G）。要約すると、T<sub>EX</sub>の高次元プロファイリングは、HIV特異的CD8 T細胞およびTILの分化ランドスケープの明確な特徴を同定した。

#### 【0284】

##### 実施例14：HIV感染における高次元T<sub>EX</sub>クラスター動態。

上記のtSNEアプローチは、高次元空間におけるいくつかの関係の有用な視覚化を提供するが、データのかかなりのダウンサンプリングを必要とし、場合によっては、高次元情報の損失により、データ構造のトポロジーの解釈を困難にし得る。これらのT<sub>EX</sub>データおよび疾患の関連性に関する追加の洞察は、フェノグラフを用いる非冗長の高次元分析アプローチによって達成された（図41A）（Levine et al.（2015）Cell 162：184-197）。このアプローチは、クラスター同定の高い安定性を可能にし、ダウンサンプリングまたは次元削減を採用しない（Melchiorri et al.（2017）Cytometry A 91：73-84）。これらの分析においては、疲弊マーカーの発現パターンの高次元の表現型の類似性に基づいてグラフを作成した。次に、表現型的に規定された細胞の近隣を、密接に相互接続された細胞のクラスターに分割した。この分析は、疲弊マーカーの発現に基づいて25個のクラスターを同定した（30個のクラスターを計算したが、クラスターc14、c20、c22、c24、c30にはイベントがほとんど含まれていなかったため、以降の分析から除外した。STAR法を参照のこと）。この分析が、古典的に規定されたT<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、およびT<sub>EMRA</sub>を表すクラスターを同定するか否かをテストした（図39C）。実際に、いくつかのフェノグラフクラスターは、表現型的に規定されたT<sub>N</sub>およびT<sub>CM</sub>（c13、c15、またはc21などのクラスター）またはT<sub>EM</sub>（たとえば、クラスターc10、c11）もしくはT<sub>EMRA</sub>様細胞（たとえば、クラスターc10、c9、c23）の特徴を持つ集団と明確に関連していた（図41B、41C）。対照的に、PD-1+ CD8 T細胞へのクラスターの寄与は多様性を示し、集団の15%超に寄与する単一のクラスターはなかった（図41B）。この分析における約9~12のクラスターには、3つまたはそれを超える（最大9）のIRの共発現に基づく推定されるT<sub>EX</sub>が含まれ（c1、c2、c3、c4、c9、c16、c18、c19、c27、c28、c29）、他方、9つのクラスターはT<sub>N</sub>および/またはT<sub>CM</sub>表現型に関連しており、3 IRの細胞が含まれた。T<sub>EM</sub>およびT<sub>EMRA</sub>表現型細胞は3~8個の異なるクラスターに含まれた。特に、これらのク

ラスターの3つには、IRが3未満の細胞が含まれていたが、古典的に規定された $T_{EM}$ および $T_{EMRA}$ を含む他のクラスターにもIRを発現するクラスターが含まれた(図4 1 C)。この観察は、 $T_{EX}$ 表現型細胞がほとんど $CD27^+ CD45RA^-$  (Bengsch et al. (2010) PLoS Pathog 6, e1000947; Huang et al. (2017) Nature 545 : 60-65)であり、 $CD27-CD45RA^+$ 表現型を獲得する追加の $T_{EX}$ を伴う $T_{EM}$  ( $CCR7-CD45RA^-$ )の古典的な定義によって規定される $CD8$  T細胞サブセットに分類されるという事実を反映している可能性が高い。したがって、これらの異なる $CD8$  T細胞集団を解析するには、この高次元のアプローチが必要である。

#### 【0285】

このアプローチをウイルス特異的 $CD8$  T細胞に適用すると、HIV、FLU、およびCMV特異的 $CD8$  T細胞のための異なるクラスター分布パターンが明らかになった(図4 1 D)。T-bet、グランザイムB、パーフォリン、および $CD57$ の発現が高い細胞を含むクラスターc10、しばしば $T_{EMRA}$ および/またはT細胞セネッセンスに関連する表現型は、CMV特異的 $CD8$  T細胞において強く富化された(図4 1 D)。対照的に、 $T_{CM}$ のハロマークを持つクラスターc15は、血液から単離されたFLU特異的 $CD8$  T細胞において富化された(図4 1 B、4 1 C、4 1 D)。しかしながら、肺からのFLU特異的 $CD8$  T細胞はクラスターc18およびc28において富化され、組織に帰るのに用いられ、レジデントメモリーT細胞( $T_{RM}$ )によってしばしば発現される分子である $CD103$ を発現した(図4 7) (Gordon et al. (2017) J Exp Med 214:651-667; Hombrink et al. (2016) Nat Immunol 17:1467-1478; Schenkel and Masopust (2014) Immunity 45:389-401)。高レベルの疲弊マーカーを発現するクラスターにおいて富化されたHIV特異的 $CD8$  T細胞(図4 1 C、4 1 D)、およびこれらの $T_{EX}$ クラスターの分布は、ART処理されたHIV患者において変化した(図4 1 D)。

#### 【0286】

T細胞疲弊は、初めは、変化した、しばしば乏しい機能によって規定されていた(Zajac et al. (1998) J Exp Med 188 : 2205-2213)。しかしながら、 $T_{EX}$ は機能的に不活性ではない。むしろ、疲弊は、いくつかのケースでは $IFN-\gamma$ 産生の低下によって規定されるが、 $IFN-\gamma$  および $TNF$ を同時に生産する乏しい能力(すなわち、多機能性が低い)、 $IL-2$ の欠如、およびグランザイムなどの細胞毒性分子の発現にもかかわらず細胞毒性の低下によって規定される(Badr et al. (2008) J Virol 82: 10017-10031; Betts et al. (2006) Blood 107:4781-4789; Blackburn et al. (2010) J Virol 84:2078-2089; Brooks et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:20428-20433; Buggert et al. (2014) PLoS Pathog 10, e1004251; Wherry et al. (2003) J Virol 77:4911-4927; Wherry et al. (2007) Immunity 27:670-684)。しかしながら、 $T_{EX}$ は、いくつかの $IFN-\gamma$ を生産し、ケモカインも強力に生産する能力をしばしば保持する(Betts et al. (2006) Blood 107:4781-4789; Blackburn et al. (2010) J Virol 84:2078-2089; Crawford et al. (2014) Immunity 40(2):289-302)。我々のトランスクリプトームおよびエピゲノムのプロファイリングは、機能的ケモカインおよびサイトカイン、すなわちケモカイン $CCL3$ 、 $XCL1$ および免疫調節性サイトカイン $IL10$ 、 $IL-21$ 、および $T_{EX}$ におけるアンフィレグリンのアップレギュレーションも示した。したがって、 $T_{EX}$ は、完全な病原体または腫瘍根絶を媒介することはできないが、組織の損傷を制限しながら重大な宿主病原体または宿主腫瘍の平衡を可能に得る機能を有する(Wherry and Kurachi, 2015)。表現型によって同定された高次元 $T_{EX}$ クラスターも疲弊の機能的特徴を反映するか否かは不明のままである。したがって、疲弊の機能的特徴および上記で決定されたクラスターとの関係を調べた。ウイルス血症のHIV患者からの $CD8$  T細胞を刺激し、 $IFN-\gamma$ 、 $TNF$ 、 $IL-2$ 、 $IL-10$ 、 $IL-21$ 、 $CCL3$ 、 $XCL1$ 、およびアンフィレグリンの発現を、インビトロ刺激の前後で安定した発現を有する分子に重点を置いて、上記で分析した13の表現型疲弊マーカーのフレームワーク上に構築されたサイトカインパネルを用いて検査した(図3 9 A)。ケモカインおよびサイトカインの産生を表現型クラスターにマッピングすると、異なるクラスター機能性が同定された(図4 1 E)。我々のエピゲノム解析と一致して

、CCL3、XCL1、IL-10、およびIL-21の発現は、c2、c16、およびc29などのクラスターにおいて、他の疲弊の特徴とともに同定された。対照的に、エピゲノム的に同定されたアンフィレグリンは、T<sub>EX</sub>クラスターではなく、主にナイーブまたはメモリー表現型（たとえば、c13、c15、c17、c21；図4 1 E）のクラスターにおいて染色された。ただし、このマウスのゲノムとヒトのタンパク質データの差異の理由は現在、不明である。IFN- $\gamma$ 産生を保持するがTNF産生を失った（すなわち、多機能性が低下した）細胞は、クラスターc3、c16、c29と顕著に関連しており、疲弊の定義と一致する多くのIR（図4 1 C、4 1 E）も同時に発現していた。比較を可能にするために、機能的「疲弊スコア」（FES）を、疲弊の機能的ハロマークについて増加し（たとえば、TNFまたはIL-2産生の喪失、ケモカインの上方制御）、エフェクターまたはメモリー機能性の存在により減少する（たとえば、IL-2産生またはIFN- $\gamma$  およびTNFの同時産生）、すべてのクラスターに対して開発した（材料および方法を参照）。最も高いFESは、6-7 IRの共発現およびT<sub>EX</sub>の他の特徴に基づいて、高度に疲弊したT細胞に表現型的に類似したクラスターc29について観察された（図4 1 C、4 1 E）。この分析は、高いFESの9つのクラスターを同定し、高IR共発現のクラスターにもマッピングされた。しかしながら、3-4 IRを共発現した3つのクラスター（c18、c19、c28）は、中程度から低いFESを有した。予想通り、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、T<sub>EMRA</sub>は、FESが低いクラスターについて富化された（図4 1 E）。しかしながら、特に、健康な対象でさえ、特にc5、c9、c16、およびc27などのより低いFESのものを含む、T<sub>EX</sub>クラスターの検出可能な頻度を有する（図4 1 F、4 1 D）。

【0287】

次に、これらのT<sub>EX</sub>クラスターが、HIV疾患の重症度とともに、ARTによるウイルス複製の制御後にいかに変化するかを検査した。c2およびc29などのT<sub>EX</sub>クラスターは、進行したHIV感染で拡大したが、ART治療で減少した（図4 1 F）。c1、c2、c4、c11、c18、c28、およびc29などのクラスターは、高いウイルス負荷および低いCD4/CD8比の両方にポジティブに関連していた（図4 1 G、左上のパネル）。T<sub>EX</sub>クラスターc5、c9、およびc27を含む他のクラスター、ならびにc15およびc17を含むT<sub>N</sub>/T<sub>CM</sub>クラスターは、低いウイルス負荷およびより高いCD4/CD8比と関連していた。対照的に、T<sub>EM</sub>およびT<sub>EMRA</sub>ならびに低FESの特徴を持つクラスターであるc10などのクラスターは、ウイルス負荷の変化よりも低いCD4/CD8比と強く関連しており、c10は、特に、HIV感染において拡大され、これは、バースタンダー効果を示唆する（図4 1 G）。多くのT<sub>EX</sub>クラスターは重度のHIV疾患（c29、c2、c3、c4など）に関連しており、IR（たとえばPD-1、2B4、CD160、およびTIGIT）の共発現を示し、高いEomes、激しい疲弊と一致した表現型を有した（Paley et al., 2012）（図4 1 C、4 1 G）。これらのクラスターのいくつかには、活性化および代謝調節のマーカーも含まれた（たとえば、CD38+ CD39+発現、c1およびc29）。対照的に、他のクラスターは軽度のHIV（たとえば、c16、c27、c9）において富化され、これらの1つ、c16には、TCF1およびCD127の発現を伴うCXCR5+細胞が含まれ（図4 1 C、4 1 G）、胚中心へのホーミングに関与する表現型に似ていた（He et al. (2016) Nature 537: 412-428; Petrovas et al. (2017) Sci Transl Med 9）。分離したクラスターであるc27は、IRおよび他の疲弊マーカーに加えて、前駆体T<sub>EX</sub>（CD127、いくつかのTCF1など）と一致する分子も発現した。軽度の疾患との関連は、PD-1が低い2B4、CD160およびTIGITが高く、細胞毒性分子（c9）の発現が高いクラスターでも観察され、このことは、PD-1が存在しない場合の潜在的な保存された細胞毒性の可能性および疲弊を示唆する。一緒に、これらの結果は、HIV疾患の進行または治療に異なってリンクしたT<sub>EX</sub>の複数のサブタイプを示し、ウイルス負荷の変化に優先的に関連するT<sub>EX</sub>および他のT細胞サブセットの特徴、CD4/CD8比によって捕捉された免疫調節不全の全体的な低下およびARTに対する応答を同定した。

【0288】

実施例 15：T<sub>EX</sub>クラスターの明確な機能的、表現型的、および転写的特徴。

これらの分析がT<sub>EFF</sub>からT<sub>EX</sub>を区別できるか否かをテストするために、T<sub>EFF</sub>をインビトロで全PBMCまたはソートされたT<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、もしくはT<sub>EMRA</sub>で開始して生産し、結

10

20

30

40

50

果として得られる $T_{EFF}$ の機能的および表現型プロファイルを検査した。 $T_{EFF}$ は、 $T_{EX}$ を $T_{EFF}$ から区別する、高い多機能性、IFN- およびTNF共産生、ならびに低いFESスコアを有した。FESが高次元表現型にいかに関連するかをテストするため、tSNEを用いて $T_{EX}$ のフェノグラフに由来するクラスターをプロットし(図4 8)、FESを疲弊空間のこの簡略化されたクラスターマップに投影した(図4 2 B)。正の疲弊スコアのクラスターは、このマップですぐ近くにある(図4 2 B)。 $T_{EX}$ クラスターにおける転写因子発現パターンの分析は、高いFESを伴うクラスターにおける高いEomesおよびTOXを示した(図4 2 C)。対照的に、高いT-betおよびHeliosは、多くの細胞毒性分子を発現する $T_{EX}$ クラスターc9に存在した。最後に、TCF1はクラスターc1およびc16を含む $T_{EX}$ のサブセットによって発現されたが、この転写因子は非 $T_{EX}$ において最も高く(図4 2 C)、 $T_N$ および $T_{MEM}$ におけるTCF1の主要な役割と一致していた。これらの結果は、高次元の $T_{EX}$ クラスターが異なる表現型、転写および機能特性を示すことを示した。

【0 2 8 9】

#### 実施例 1 6 : 疾患の関連を調査するための $T_{EX}$ クラスターの使用。

仮説は、重度のHIVに関連する $T_{EX}$ クラスター(「Disease Associated  $T_{EX}$ 」、( $DA T$ ))の、軽度の疾患に関連するもの(「Health Associated  $T_{EX}$ 」、( $HAT$ ))と比較した分布は、 $T_{EX}$ 生物学に基づく疾患状態の指標となり得るというものである(図4 2 D)。この仮説をテストするために、FLU、CMV、またはHIV特異的T細胞を、FESが最も高い上位2または上位9の $T_{EX}$ クラスターの頻度の合計について、および、重度対軽度のHIV疾患に関連するクラスターの比率( $T_{EX}$ 比率)について分析した。HIV特異的T細胞は、 $T_{EX}$ クラスターの頻度が高く、FLUおよびCMV特異的T細胞と比較して、疾患関連対健常関連 $T_{EX}$  クラスター(Disease Associated to Health Associated  $T_{EX}$  clusters)の比率も高かった(図4 2 E)。 $T_{EX}$ 比はまた、ART療法中の変化を明らかにし、健常関連 $T_{EX}$  クラスター(Health Associated  $T_{EX}$  clusters)が増加した(図4 2 E)。HIV特異的CD8+ T細胞で観察されたこれらの発見は、健康な個体と比較したウイルス血症のHIV患者におけるTop2およびTop9の $T_{EX}$ クラスターの富化およびより高い $T_{EX}$ 比を示し、治療によるいくらかの減少を示す、総CD8 T細胞のプロファイリングに拡張することができた(図4 2 F)。重度または軽度のHIVとクラスターを関連付ける相関関係はウイルス血症の未治療患者から得られたが(図4 1)、 $T_{EX}$ クラスターとCD4/CD8比との相関関係はART治療を受けた患者でも安定したままであった(図4 9)。したがって、 $T_{EX}$ 生物学の詳細な分析は、HIV疾患の変化に対する洞察を提供することができ、疾患のさまざまな段階に  
関与する疲弊の特定の機能を理解し、 $T_{EX}$ 生物学における変化が新しい治療アプローチに  
いかに関連付けられるかを同定するためのフレームワークを提供し得る。

【0 2 9 0】

#### 実施例 1 7 : 肺癌における $T_{EX}$ における臓器および疾患特異的变化。

1つの未解決の問題は、疲弊の主要な特徴がさまざまな疾患および/または組織部位において共有されるか否かである。この問題を調査するために、上記で概説したアプローチを用いて、末梢血、肺腫瘍、巨視的に影響を受けていない肺組織のサンプルを用いて、新たに診断された肺癌の患者からのCD8 T細胞を検査した。 $T_N$ および $T_{CM}$ 様の特徴を持つクラスター(c13、c15、c21)は、健康な対象と比較して肺癌患者PBMCにおいて減少した(図4 3 A)。 $T_{EX}$ クラスターc2およびc29、ならびにTILにおける $T_{EM}/T_{EMRA}$ クラスターc10における富化を含む、クラスター分布の大きな変化が血液、肺組織、およびTIL間で観察された(図4 3 A)。組織レジデンシーにしばしば関与するCD103分子を発現するクラスターは、関与していない肺組織およびTILサンプル(c11、c18、c28など)において富化され、腫瘍微小環境においてさえ $T_{EX}$ 集団と非 $T_{EX}$ 集団の両方への肺組織のインプリントを示唆する(図4 3 A)。 $T_{RM}$ 様集団は、FLU特異的細胞も含んだ(図4 7)。したがって、肺癌患者の気道における $T_{EX}$ の一般的な特徴を持つ細胞は、血液で観察されるものと重複するが、この解剖学的位置は、組織特異的プログラミングに関連し得る $T_{EX}$ および非 $T_{EX}$ 集団の変化にも関連付けられる。

【0 2 9 1】

10

20

30

40

50

### 実施例 18：機能的に不十分な肺癌TIL集団におけるTEXシグネチャの富化。

これらのTILクラスターがいかに機能に関連するかを調べるため、短期のインビトロ刺激後にIFN- $\gamma$ 産生を検査した(図43B)。次に、サンプルを高および低IFN- $\gamma$ プロデューサーにグループ化した。上記で開発したFESクラスタリングアプローチ(図41)を用いて、健康な対象からのPBMCを、肺癌患者からのPBMC、肺組織からのCD8 T細胞、およびTILと比較するクラスター富化の変化をプロットした(図43C)。TILは、高および低IFN- $\gamma$ 機能性とも比較した(図43C)。肺癌患者からの血液は、T<sub>N</sub>およびT<sub>CM</sub>クラスター(c13、c15)の顕著な損失およびTEXクラスターc4およびc9の富化があった。肺組織は、CD103を発現するc11、c18、c28などのクラスターについて富化された(図43C)。より機能的なTIL集団では、非TEXクラスターc11およびc18、ならびにクラスターc28が富化されたのに対し、低機能性TILでは、TEXクラスターc4、c27、およびc29が過剰に示された(図43C)。TEXの不均一性およびHIV感染における役割の評価を調整した後、これらの結果を用いて腫瘍の状況における疲弊および疾患の検査に情報を提供できるか否かを調査した。PBMCと比較して、肺およびTILからのCD8 T細胞は、上記で同定された上位2または上位9のTEXクラスターの合計において富化された(図43D)。さらに、TEX FESクラスター比は、隣接する肺と比較してTILサンプルにおいて強く増加した(図43D)。特定のクラスターを検査すると、c3、c4、およびc6はTILにおいて富化され、IFN- $\gamma$ 産生が低く、c8およびc29でも同様の傾向であった(図43E)。これらのクラスターはPD-1およびEomesを共発現し、多くは複数のIRの高い共発現も有した(図41C、43F)。対照的に、c28は、IFN- $\gamma$ 産生が高い腫瘍で過剰発現されていた(図43C、43E)。このクラスターは、CD103ならびにいくつかのPD-1および他の疲弊関連分子(CD39、CTLA4、TOXなど)を発現したが、Eomesのような重度の疲弊の他の特徴の発現および他のIR(たとえば、2B4、CD160、TIGIT)の最も高い発現を欠如し、HIVデータにおいて高いFESも有さなかった。高機能および低機能TILには「健康関連」TEXクラスター(上記で定義)が含まれたが、低機能TILは「疾患関連」TEXクラスターにおいて実質的に富化された(図43G)。これらの結果は、機能不全の腫瘍微小環境は、機能的なT<sub>RM</sub>様集団および軽度の疲弊特性からのより重度の機能不全TEXへの移行によって規定されることを示す。さらに、これらの分析は、疾患特異的富化(肺組織および肺TILにおけるCD103+クラスターの傑出など)への追加的洞察とともに、HIVおよび癌全体での保存されたTEX生物学を明らかにした。これらの結果は、組織、疾患の種類、および疾患の重症度にまたがるTEXの分化ランドスケープをつなぐために、エピゲノム的に誘導されたCyTOFアプローチを用いる能力を実証する。さらに、このアプローチは、共通のTEX生物学および疾患特異的特徴を明らかにする。

【0292】

### 実施例 19～22の材料および方法

#### エンハンサー-qPCR法の概要

##### 1. 標的細胞富化

A. テストする疾患のための関連する細胞は、適切な表面抗原(癌患者のためのPD1および/またはCD39など)を用いる磁気ビーズ分離によって、全血またはPBMCから富化した。

【0293】

##### 2. 膜溶解およびクロマチン遊離

###### A. サンプル洗浄

(i) 標的細胞を1.5mlエッペンドルフDNA Lo-Bindチューブに移し、650xgで4分で7分間遠心した。(ii) 培地を吸引し、500ulの冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)と交換した。次に、細胞を再び650xgで7分間、4分で遠心した。(iii) 次に、PBSを吸引し、別の500ulの冷PBSと交換した。細胞を再び650xgで7分間4分で遠心した。

【0294】

###### B. 外膜および核膜溶解

(i) PBSを吸引し、適切な量の細胞溶解培地(10 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM Na

Cl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Tween20)と交換した。細胞溶解培地の量は、反応中の標的細胞の数に合わせて調整した(50,000細胞未満の場合は50ul、50,000細胞の場合は50ul、さらに1,000の標的細胞あたり1ulの溶解培地を追加)。(ii) P200ピペットで細胞を溶解培地で10回混合し、氷上で5分間インキュベートした。(iii) 次に、細胞を650xgで10分間4 で遠心した。

【0295】

### 3. 転位反応

#### A. 転位反応

(i) 溶解溶液および細胞デブリを吸引し、適切な量の転位反応溶液と交換した。転位反応溶液の量は、反応中の標的細胞の数に合わせて調整した(25,000細胞未満の場合は25ul、25,000細胞の場合は25ul、さらに1,000の標的細胞あたり1ulの反応溶液を追加)。50ulの反応の場合、転位反応溶液には、25ulの2x ATAC TDバッファー(20mM Tris pH 7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、20% DMF)、22.5ulのNuclease-free UltraPure Water、2.5ulのTn5アダプターをロードしたトランスポザーゼ混合物(Illumina、FC-121-1031)が含まれる。(ii) 細胞を転位溶液中でP200ピペットで10回混合し、37 で45分間インキュベートした。

【0296】

#### B. サンプルのクリーンアップ

(i) 転位された遺伝子材料の精製は、製造元の説明(Qiagen、28204)に従ってMin Elute Reaction Cleanup Kitを用いて行った。(ii) サンプルは、11ulの溶出バッファー(EB; 10mM Tris、pH 8.0)でカラムから溶出させた。

【0297】

### 4. ライブラリー増幅

#### A. ライブラリー増幅

(i) 10ulの転位したDNAサンプルをAmplification Solution(10ulヌクレアーゼフリー水、25ulのNEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix(New England Biolabs、M0541)、2.5ulのN501プライマー、2.5ulのN701プライマー(Illumina、FC-121-1012)中で増幅した。サンプルを完全に混合し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)8 - ストリップ100ul反応チューブに移した。ライブラリー増幅は、次のプロトコルを用いて加熱蓋付きのサーモサイクラーで行った: 1. 72 - 5分、2. 98 - 30秒、3. 98 - 10秒、4. 63 - 30秒、5. 72 - 60秒。ステップ3~5をさらに11回繰り返した。

【0298】

#### B. サンプルクリーンアップ

(i) 転位された遺伝子材料の精製は、製造元の説明(Qiagen、28004)に従ってMin Elute PCR Purification Kitを用いて行った。(ii) サンプルは、20ulの溶出バッファー(EB; 10mM Tris、pH 8.0)でカラムから溶出した。

【0299】

### 5. 健常および疾患特異的OCRライブラリーの編集

#### A. 疾患特異的OCR

(i) 疾患特異的OCRは、1) DESeq2、2) スペクトルまたはバйкаラスタリング、3) ランダムフォレスト、を用いて患者のサンプルを通常のドナーと比較するさまざまな方法で同定する。ヒト疲弊、エフェクター、およびメモリーOCRのリストは、種間マッピングおよびマウスにおける規定されたCD8 T細胞サブセットを用いて生成されている(ドキュメント)。これらは、多くの疾患に関連している可能性がある。疾患のバイオマーカーとして用いることができる正常なドナーと比較した、黒色腫患者における血液非ナীবCD8 T細胞およびTregにおいて異なるOCRが定義されている(ドキュメント)。

【0300】

#### B. 陽性対照OCR

(i) 陽性対照OCRは、正常なドナーおよび疾患患者におけるすべてのCD8 T細胞サブセットにおいてオープンであるゲノム領域として同定される。具体的には、候補の陽性OCR

10

20

30

40

50

は、正常なドナーおよび疾患患者の間で有意ではないものとして選択される。このリストは、平均の上位四分位数、すべてのサンプルにわたるカウントの分散の最小四分位数、および160の最小ピーク長でフィルター処理され、次に分散でソートされる（低から高）。

【0301】

#### C. 陰性対照OCR

(i) 陰性対照OCRは、無関係な細胞型においてオープンであるが、ベッドツール・インターセクトによって決定されるCD8 T細胞サブセットにおいてはオープンでない領域として同定される。候補の陰性対照OCRのこのリストは、関連する各患者ATAC-seqサンプル（bedtoolsカバレッジ）の読み取りの数を計算するのに用いられ、次に患者サンプル全体のカウントの平均でソートされる（低から高）。

10

【0302】

#### 6. OCR特異的qPCRプライマーの生成

A. NCBI Primer-BLASTを用いて、次のパラメーターで2つのプライマー対を生成した：アンプリコンサイズ80～120塩基対；最適プライマー融解温度60；最新のヒトまたはマウス参照ゲノムアセンブリでの特異性テスト。各OCR領域について、ピーク中心に最も近い上位2つのプライマーセットを選択した。各陽性対照OCR遺伝子座および疾患関連OCRについて、領域の中心50%をシーケンス入力に用いられる；陰性対照領域では、全体のピーク長が用いられる。

【0303】

B. プライマーは、適切なゲノムDNA（マウスまたはヒト）でテストすることにより検証され、 $R_2$ およびPCR効率値を計算する。具体的には、デルタctは、個々の標準ポイントの生のct値から最も高い標準の平均ctを引くことによって計算される；倍率変化アクセシビリティは、次に、 $2^{-\text{delta ct}}$ を計算することにより定量化される。これらの値はDNA濃度に対してプロットされ、 $R^2$ 値を計算するために線形回帰を行った。代表的なプライマー対のPCR効率は、生のct値をDNA濃度に対してプロットすることにより計算された線の傾きを用いて、次式で計算される：

20

効率 =  $-1 + 10^{(-1/\text{slope})}$

qPCR分析は、 $R^2$ 値が0.95を超え、効率が90～110%のプライマーに対してのみ有効と見なされよう。

【0304】

30

#### 7. 多遺伝子座qPCR-ベースのテスト（中スループット、20-50ターゲット）

A. 転位および増幅されたcDNAサンプルをPCRグレードの水で33.3ng/mlの濃度に希釈した。「標準」曲線は、すべての増幅されたDNAをプールし、5ステップの5倍連続希釈を作ることによって生成した。100pg（3ul）の転位および増幅したDNAサンプル（または「標準」またはPCRグレードのウォーターブランク）を5ulのiTaq Universal SYBR Green Supermix（BioRad）およびそれぞれ1ulのフォワードおよびリバースプライマー（最終プライマー濃度500nMの場合）に加えた。サンプルを384ウェルプレートに3回重複で播種し、次に、サーマルサイクラーで次の条件で定量的に増幅した：1. 95 - 30秒、2. 95 - 1秒、3. 60 - 20秒。ステップ2～3をさらに39回繰り返した。4. 65～95の勾配、2秒/ステップで0.5 刻み（融解曲線分析用）

40

【0305】

#### 8. アレイベースのテスト（高スループット、1000ターゲット）

##### A. アレイの構築

(i) カスタマイズされた8 x 15,000マイクロアレイをAgilent Technologiesによってプリントした。アレイは、1,500の疲弊または疾患特異的OCRプローブ、500の陽性対照プローブ、500の陰性対照プローブ、ならびにハイブリダイゼーションおよびプリンティング品質管理用の500のプローブが含まれた。各プローブは、各アレイで5回、示した。カスタマイズされた各スライドに8つの同一のマイクロアレイをプリントし、8つのサンプルを同時に処理できるようにした。

【0306】

50

## B．プローブデザイン

(i) プローブは、各OCRピークセンターの上流の80塩基対および下流の80塩基対を単離することによって設計した。各160 merを30 bp間隔でユニークな60 merに分割し、NCBI BLASTを介して配列特異性をチェックした。マウスまたはヒトのRefSeqデータベースとの一致が1を超えるすべての60 merは破棄した。残りの60-merのうち、最も低いE-Valueを持つ2つをプローブ合成のために選択した。

## C．マイクロアレイ分析のためのサンプル調製

(i) 患者またはマウスからのOCRライブラリーは、上記のプロトコルに従って調製した。マイクロアレイ解析のために、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Cy5, Agilent Technologies 5190-2307) を用いてラベルされたcRNAを生成した。サンプルをカスタムチップにロードし、One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysisテクニカルマニュアル (Agilent Technologies) に記載されるプロトコルに従ってスキャンした。

【0307】

## 9．データ分析

A．エンハンサーアクセシビリティの定量化は、2つのアプローチを用いて計算される：1) 内部正規化：疾患関連OCRの相対的アクセシビリティが、患者サンプル内の陽性および陰性OCRと比較される。2) 外部正規化：疾患関連OCRのアクセシビリティが、合成標準と比較される。この分析は、各疾患関連OCRのアクセシビリティの絶対値を提供し、患者間の比較を可能にする。

【0308】

### エンハンサー-qPCR開発および最適化実験

ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞の生産。ナイーブマウスCD8 T細胞を単離するために、C57/BL6マウスから脾臓を採取し、シリンジで70umフィルター上で分離した。細胞をフィルターを通してPBSで3回洗浄した。分離した細胞を、摂氏4度で7分間、1650 RPMでスピンドウンした。PBSを吸引し、1mlのAck Lysis Buffer (Invitrogen) で置き換えた。細胞をAck中で室温で5分間インキュベートした。溶解バッファーを、10% ウシ胎児血清 (FCS) を含む10mlのPBSでクエンチした。次に、細胞混合物を別の70umフィルターを通して、細胞デブリおよび脂肪組織を除去した。細胞を1500 RPMで5分間、室温で遠沈させ、1億個の細胞あたり1mlの磁気分離バッファー (MSB、10% FCSおよび4mM EDTAを含むPBS) に再懸濁した。MSB 1 mlあたり50 ulの正常ラット血清を添加して、非特異的な抗体相互作用をブロックした。続いて、以下のビオチン化抗体を1:200希釈で加えた：抗CD4、抗NK1.1、抗CD19、抗B220、抗CD11c、抗CD11a、抗Ter119、抗CD44。MSB 1mlあたり125ulのストレプトアビジン磁気ビーズ (Miltenyi) を添加する前に、抗体 - 細胞混合物を室温で15分間インキュベートした。混合物を室温でさらに15分間インキュベートした後、MSBで総容量を3 mlにした。次にサンプルを穏やかに混合し、磁気分離器 (StemCell) に室温で10分間置いた。非結合画分を15mlのコニカルチューブにデカントした。サンプルを10mlのPBSで2回洗浄し、次のステップまで氷上に置いた。

【0309】

インビトロで分化したエフェクター細胞を生成するために、上記のステップからの精製されたナイーブCD8 T細胞をカウントし、10% FCS、500uM  $\beta$ -メルカプトエタノール、20mM HEPES、非必須アミノ酸 (1:100、Invitrogen) ピルビン酸ナトリウム (1:100、Invitrogen)、ペニシリン、およびストレプトマイシンを補充したRPMI培地1mlあたり $1 \times 10^6$ 細胞で再懸濁した。3mlの細胞混合物を12ウェルクラスターディッシュのウェルに入れた。細胞は、抗マウスCD3e (1:1000、BioLegend)、抗マウスCD28 (1:2000、BioLegend)、および100U/ml組換えヒトIL-2 (rhIL-2、Peprotech) で24時間、活性化した。次に、細胞を各ウェルから収集し、カウントし、温かいPBSで1回洗浄した。活性化CD8 T細胞をエフェクター細胞に分化させるために、補充されたRPMIの1mlあたり $1 \times 10^6$ で再懸濁し、rhIL-2を100U / mlとし、6ウェルクラスターディッシュ

10

20

30

40

50



のウェルあたり3 mlの細胞をプレーティングした。これを、活性化後合計6日間になるまで、さらに4日間、繰り返した。

#### 【0310】

膜溶解およびクロマチン遊離。細胞を1.5mlエッペンドルフDNA Lo-Bindチューブに移し、摂氏4度で650xgで7分間スピンドウンした。培地を吸引し、500ulの冷リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) と交換した。その後、細胞を再度、650xgで4度、7分間遠心した。次に、PBSを吸引し、さらに500ulの冷PBSと交換した。細胞を再び650xgで4度で7分間スピンドウンした。PBSを吸引し、適切な量の細胞溶解培地 (10 mM Tris-HCl pH8.0、10 mM NaCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% IGEPAL) と交換した。細胞溶解培地の容量は、反応中の標的細胞の数に合わせて調整した (50,000細胞未満の場合は50ul未満、50,000細胞の場合は50ul、さらに1,000の標的細胞あたり1ulの溶解培地を追加)。細胞をP200ピペットで溶解培地中に10回混合し、氷上で5分間インキュベートした。次に、細胞を摂氏4度で650xgで10分間遠心した。

10

#### 【0311】

転位反応およびサンプルのクリーンアップ。溶解液および細胞デブリを吸引し、適切な量の転位反応液と交換した。転位反応溶液の量は、反応中の標的細胞の数に合わせて調整した (5,000細胞未満の場合は5ul、5,000細胞の場合は5ul、さらに1,000標的細胞あたり1ulの反応溶液を追加)。50ulの反応の場合、転位反応溶液には、25ulの2x ATAC TDバッファー (20mM Tris pH 7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、20% DMF)、22.5ulのNuclease-free UltraPure Water、2.5ulのTn5アダプターをロードしたトランスポザーゼ混合物 (Illumina、FC-121-1031) を含む。(ii) 細胞を転位溶液中でP200ピペットで10回混合し、37℃で45分間インキュベートした。

20

#### 【0312】

転位された遺伝材料の精製は、製造元の指示 (Qiagen、28204) に従ってMinElute Reaction Cleanup Kitを用いて行った。(ii) サンプルは、11ulの溶出バッファー (EB; 10mM Tris、pH 8.0) でカラムから溶出させた。

#### 【0313】

ライブラリ増幅およびサンプルのクリーンアップ。10ulの転位したDNAサンプルをAmplification Solution (10ulのヌクレアーゼフリー水、25ulのNEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix (New England Biolabs、M0541)、2.5ulのN501 Primer、2.5ulのN701 Primer (Illumina、FC-121-1012) において増幅した。サンプルを完全に混合し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 8ストリップ100ul反応チューブに移した。ライブラリーの増幅は、次のプロトコルを用いて、加熱蓋付きのサーモサイクラーで行った: 1. 72度- 5分、2. 98度- 30秒、3. 98度- 10秒、4. 63度- 30秒、5. 72度- 60秒。ステップ3~5をさらに11回繰り返した。

30

#### 【0314】

転位された遺伝子材料の精製は、製造元の指示 (Qiagen、28004) に従ってMinElute PCR Purification Kitを用いて行った。(ii) サンプルは、20ulの溶出バッファー (EB; 10mM Tris、pH 8.0) でカラムから溶出した。

#### 【0315】

陽性対照OCR、陰性対照OCR、および関心のOCRの同定。Pauken et al.からのCD8 T細胞ATAC-seqライブラリーを添付のスク립トを用いて処理した。ナイーブ、エフェクター、メモリー、および疲弊特異的OCRは、他のすべてと比較して1つのサブセットで統計的に増加しているとして規定された (DESeq2)。陽性対照遺伝子座は、すべてのCD8 T細胞サブセット (ナイーブ、エフェクター、メモリー、および疲弊) においてオープンである領域として規定され、いずれのペアワイズ比較 (DESeq2) においても統計的に異なる: CD8、CD3e、CD3g、TCF1に関連するOCR。陰性対照遺伝子座は、3T3細胞株でオープンであるが、4つのマウス初代CD8 T細胞サブセット (ナイーブ、エフェクター、メモリー、または疲弊: 遺伝子Col1a2およびTnagl1に関連するOCR) においてはオープンでない領域として規定された。関心のOCRはエフェクターおよび疲弊特異的OCRリス

40

50

トから選択した：遺伝子IFN、IL-2RA、PD-1に関連するOCR。

#### 【0316】

qPCRによる対照および疾患関連OCRライブラリーの検証。各OCR遺伝子座について、アンプリコンが重複しない2つのプライマー対を生成した。OCR配列をNCBI Primer-BLASTに入力し、プライマー対を次のパラメーターで生成した：アンプリコンサイズ80～120塩基対；最適プライマー融解温度60；最新のヒトまたはマウス参照ゲノムアセンブリの特異性テスト。返されたプライマーのうち、OCR配列の中心に最も近いアンプリコンを持つもののみを選択した。最後に、重複しないアンプリコンを備えた上位2つの「中央」対を、後続のアッセイにおいて用いるために選択した。

#### 【0317】

qPCRによるプライマー検証。各プライマーについて、qPCR増幅後に融解曲線分析を行った。さらに、すべてのサンプルから増幅されたcDNAをプールし、連続的に希釈することにより、cDNA「標準」を作成した。デルタctは、生のct値から最も高い標準の平均ctを差し引くことによって計算した；倍率変化アクセシビリティは、その後、 $2^{-\Delta ct}$ を計算することにより定量化した。これらの値をDNA濃度に対してプロットし、 $R^2$ 値を計算するために線形回帰を実行した。代表的なプライマー対のPCR効率は、生のct値をDNA濃度に対してプロットすることから計算された線の傾きを用いて、次式で計算した：

$$\text{効率} = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$

qPCR分析は、 $R^2$ 値が0.95を超え、効率が90～110%のプライマーに対してのみ有効と見なした。

#### 【0318】

個々のサンプルのアクセシビリティを定量化するために、デルタCtは、最初に、次式で実験用プライマーのための個々のCt値からすべての陽性対照プライマー全体の平均Ctを差し引くことによって計算した：

$$\Delta Ct = Ct_{\text{experimental primer}} - (Ct_{\text{CD3g Pr 1}} + Ct_{\text{CD3g Pr 2}} + Ct_{\text{CD3e UTR 1}} + Ct_{\text{CD3e UTR 2}}) / 4$$

倍率変化アクセシビリティは、 $2^{-\Delta Ct}$ を計算することにより、後に定量化した。

#### 【0319】

実施例19：エピジェネティック状態および治療的調節を調べるためのエンハンサー開放性PCRアッセイ

アッセイの概要と概略を図50に示す。最初に標的細胞が富化され、次に溶解されてクロマチンを収集し、次にこれは、オープンクロマチン領域(OCR)にのみ転位して統合することができる、Tn5アダプターをロードしたトランスポザーゼで処理される。このDNAライブラリーは、アダプタータグ付きの転置されたDNAのみが増幅される1回目の増幅にかけられる。続いて、疾患特異的OCRならびに陽性および陰性対照OCRに対するプライマーを伴い、これらの転位および増幅されたDNAライブラリーに対してqPCRが実行される。正常なドナーおよび患者の両方が対照オープンクロマチン領域において同様のアクセシビリティを有するはずであるが、疾患特異的OCRは患者でのみ定量化可能なアクセシビリティを有し、正常なドナーではそうではないはずである。最終的に、このアッセイは、ハイスループットアレイを介した多遺伝子座試験用にスケールアップすることができる。

#### 【0320】

実施例20：代表的なプライマーのqPCR効率

図51は、アッセイのパフォーマンスを示し、PCR読み出しが直線的にスケールリングすることを示す。DNA「標準」は、すべてのサンプルからの増幅されたDNAをプールし、連続的に希釈することによって作成した。デルタctは、生のct値から最も高い標準の平均ct(またはサイクルしきい値)を差し引くことによって計算した；倍率変化のアクセシビリティは、その後、 $2^{-\Delta ct}$ を計算することにより定量化した。これらの値をDNA濃度に対してプロットし、線形回帰を行って、代表的なプライマー対の $R^2$ 値を計算した(図51、最上列)。代表的なプライマー対のPCR効率は、生のct値をDNA濃度に対してプロットして計算された線の傾きを用いて、次の式で計算した(図51、下の行)：

10

20

30

40

50

効率 =  $-1 + 10^{(-1/\text{slope})}$

これらの代表的なプライマーセット (Tcf7、CD8、およびPD1) では、qPCR効率は比較的高くて100%に近く、このことは、ATAC転位および増幅から生成されたDNAに対するqPCRのアッセイ性能および信頼性を示す。

#### 【0321】

実施例21：既知のアクセシビリティのエンハンサーは、さまざまな細胞型全体で適切な相対的な開放性を示す

ナイーブCD8およびCD4 T細胞をマウスから単離し、マウスリンパ腫細胞株であるEL4細胞と比較した。アッセイの感度を評価するために、複数の細胞濃度を重複してテストした。様々な細胞型にわたる既知のアクセシビリティの代表的な遺伝子座 (図52A) を相対的な開放性についてアッセイした。定量的な正規化は細胞型特異的参照遺伝子座を必要とするので、生のct値を用いてこれらの細胞型間の相対的な開放性を評価した。ここで、低いct値は増幅、したがって相対的な遺伝子座のアクセシビリティを示し、高いct値は増幅の欠如、したがって、相対的な遺伝子座の非アクセシビリティを示す。EL4細胞ではなくナイーブT細胞においてオープンである既知のクロマチン遺伝子座であるTcf7は、CD4およびCD8 T細胞においてより低いct値を示し、これは、相対的な開放性を示し、そして、EL4細胞におけるより高いct値はこの細胞型における非アクセシビリティを示す (図52B、上)。CD8遺伝子座のエンハンサーは、CD8 T細胞でct値が低く、CD4 T細胞およびEL4でct値が高いことを示し、このことは、適切な細胞型特異的クロマチン接近性を示す (図52B、中央)。最後に、CD4 T細胞 (Treg) のサブセットであるEL4細胞においてオープンであることが知られているが、ナイーブCD8 T細胞にはない疲弊した、疲弊特異的PD1エンハンサー (Sen et al. Science. 2016、354 (6316) : 1165-1169) は、CD4 T細胞において増幅を示したがナイーブCD8 T細胞においてはそうでなかった (図52B、下)。多くのプライマーセットでは、細胞濃度の違いが信号強度の違いを示した : 10Kおよび50K細胞のct値が低いほど、アッセイ信号が強いことを示す。

#### 【0322】

実施例22：サイクル数の最適化

ナイーブCD8 T細胞を単離し、複数の陽性および陰性対照遺伝子座でのクロマチンアクセシビリティについてアッセイした。複数の細胞濃度および増幅サイクルをテストして、アッセイ感度を最適化した (図53)。さまざまなCD3遺伝子座におけるオープクロマチン領域を、T細胞特異的表面およびアイデンティティマーカーとしてのCD3の役割により、陽性対照として選択した。2つの代表的な陰性対照遺伝子座は、NIH3T3線維芽細胞とCD8 T細胞サブセットとの間のATACseq分析を比較し、T細胞ではなくNIH3T3のみで富化されたピークを選択することにより、同定した。さまざまな細胞濃度および増幅サイクル数にわたって、ナイーブCD8 T細胞は、陽性対照遺伝子座 (CD3gamma PrおよびCD3epsilon UTR) で同様の生ct値 (約25) を生成し、これらのオープクロマチン領域における均一な相対的クロマチンアクセシビリティを示す。陰性対照遺伝子座 (Tinagl1およびCol1a2) では、生のCt値は、細胞濃度および増幅サイクル数に依存する、より大きな変動を示した。しかしながら、これらの生ct値は高く (ほとんどのサンプルで 30)、これらの遺伝子座における増幅およびアクセシビリティの欠如を示す。陽性および陰性の両方の対照遺伝子座において、観察された変動の量が最も少ない条件は、12サイクルの増幅および50K細胞におけるものであった。

実施例23：陽性および陰性対照遺伝子座は、ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間の適切な相対的クロマチンアクセシビリティを示す。

エフェクターCD8 T細胞をインビトロで生成し (Pipkin et al. Immunity. 2010、32 (1) : 79-90)、同腹仔マウスから単離したナイーブCD8 T細胞と比較した。アッセイ感度を評価するために、複数の細胞濃度をテストした。T細胞特異的表面およびアイデンティティマーカーとしてのCD3の役割およびこれらの領域での既知のアクセシビリティのため、さまざまなCD3遺伝子座におけるオープクロマチン領域を陽性対照として選択した (図54A)。代表的な陰性対照遺伝子座は、NIH3T3線維芽細胞とCD8 T細胞サブセ

ットとの間のATACseq分析を比較し、T細胞ではなくNIH3T3のみで富化されたピークを選択することによって同定した。陽性対照遺伝子座、Cd3g PrおよびCD3e UTRにおけるナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞の両方について、低いct値（約25）が生成され、これは、すべての条件でのアクセシビリティを示す（図5 4 B、上および中央）。陰性対照遺伝子座Col1a2におけるすべての細胞濃度でナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞の両方について、高いct値（30）が生成され、これは、この遺伝子座が均一に閉じていることを示す（図5 4 B、下）。

【0323】

実施例24：エフェクター特異的遺伝子座は、ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間の適切なアクセシビリティの倍数変化を示す。

エフェクターCD8 T細胞をインビトロで生成し（Pipkin et al. Immunity. 2010、32（1）：79-90）、同腹仔マウスから単離されたナイーブCD8 T細胞と比較した。アッセイ感度を評価するために、複数の細胞濃度をテストした。IfngおよびIl2raを、エフェクター特異的遺伝子における既知の示差的なアクセシビリティを有する遺伝子座として選択し（図5 5 A）、ナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞間のアクセシビリティについて比較した。ナイーブCD8 T細胞は、高い生ct値（Ifng遺伝子座で25～30、Il2ra遺伝子座で約30）を示し、これは、これらの遺伝子座における低い増幅およびこれによる低いアクセシビリティを示す（図5 5 B、左パネル）。エフェクターCD8 T細胞は、さまざまな細胞濃度における生のct値における幅広い変動を示し、これは、様々な量の入力材料での示差的なアッセイ感度を示す。2K細胞の濃度では、生ct値はナイーブおよびエフェクターCD8 T細胞の間で類似していた。しかしながら、それぞれの個々のサンプルの陽性対照遺伝子座（Cd3g PrおよびCd3e UTR）全体のct値を意味するように生のct値を正規化し、これらの値から $2^{-\Delta ct}$ を計算することによって定量化されたアクセシビリティの倍率変化は、IfngおよびIl2ra遺伝子座の両方においてナイーブ細胞と比較してエフェクター細胞において有意に増加した。さらに、正規化後、アクセシビリティ倍率変化の値は、異なる細胞濃度間で類似していた（図4 2 B、右パネル）。

【0324】

他の実施形態

本明細書における変数の任意の定義における要素のリストの列挙は、任意の単一の要素またはリストされた要素の組み合わせ（またはサブコンビネーション）としてのその変数の定義を含む。本明細書における実施形態の列挙は、任意の単一の実施形態として、または任意の他の実施形態またはその一部と組み合わせ、その実施形態を含む。

【0325】

本明細書に引用されるそれぞれおよびすべての特許、特許出願、および刊行物の開示は、その全体が引用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引用して開示されているが、本発明の他の実施形態および変形が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく当業者によって考案され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような実施形態および同等の変形を含むと解釈されることを意図する。

【0326】

（表4）クラスター

10

20

30

40

50

クラスター	クラスターを区別するマーカー	PD- 1+	CD 38+	GzmK +	TIGI T+	TCF +	2B4 +	TIGI T+	CD 160	CD7	Helios	CD 103	Pige r2	CTL A4+	Tm 3+	LA G3
c1	疲弊 (IL-10+)	PD- 1+	CD 38+	GzmK +	TIGI T+	TCF +	2B4 +	TIGI T+	CD 160							
		39+	CD 39+													
c10	エフェクター メモリー (EM)/EM CD45RA+ (EMRA)	PD- 1- CD 127-	Perf +	CD57+	Gzm B+	Tbet +	KLR G1+	Gzm M+	PD- 1-							
c11	エフェクター/ 組織 レジデント メモリー	PD- 1+ Eom es+	CD 160+ TIGI T+	GzmB+	CD 103+	KLR G1+	CD 38+	TIGI T-	2B4-	CD 160-	CD 57+					
c12	不明確	PD- 1- CD1 27-	CCR 7+	CD45R A+ CD2												
c13	ナイーブ	PD- 1- CD 127+	CD 127+	CD7+	CD 26+	CD 28+	CD 27+	CD 73+	CD4 5RA + CD2	CCR 7+	TCF 1+	CD 45R A+				
c15	セントラル メモリー (CM)または ナイーブ	PD- 1- CD 127+	CD 127+	CD7+	CD 26+	CD 28+	CD 27+	CD 73+	CD4 5RA + CD2	CCR 7+	TCF 1+	CD 45R A+				
c16	軽度の疲弊	PD- 1+	CD 160+	TIGIT+	2B4+	CXC R5+	Gzm K+	CD 27+	TCF 1+							

10

20

30

40

50

クラスター	クラスターを区別するマーカー	PD-1- CD127+	CD127+	CD7+	CD26+	CD28+	CD27+	CD73+	CD45RA+ CD2	CCR7+	TCF1+	CD45RA+ CD2	CD38+	CD45RA+	Tim3+	LAG3+	CD36+	CD39+	CD200R+	Pig er2 Int
c17	早期に 活性化?	PD-1- CD127+	Tbet+	CD28+	CD103+	CD200R+														
c18	組織 レジデント メモリー	PD-1- CD127+	Tbet+	CD28+	CD103+	CD200R+														
c19	活性化/ 疲弊	CD38+ CD39+	CD16+	CXCR5+	Helios+	PD-1+ CD39+	CD45RA+	2B4+	TIGIT-	CD160-	CD7+	Pig er2+								
c2	疲弊	PD-1+ Eomes+	2B4+ CD160+ TIGIT+	Gzmb+	CD16+	Perf+	CD57+	CD38+ CD39-	Tbet+	Gzmk-										
c21	セントラル メモリー (CM) または ナイーブ	PD-1- CD127+	CD127+	CD7+	CD26+	CD28+	CD27+	CD73 +/-	CD45RA+ CD2	CCR7+	TCF1+	CD45RA+ CD2	CD38 Int	CD45RA+ CD2	Helios Int	CD38 Int				
c23	エフェクター メモリー (EM)/ EM CD45RA+ (EMRA)	Helios+ CD127+	CD45RA+ A+	CD16+	CD38+	Tox+	PD-1-													
c25	EM	PD-1- CD127+	CD127+	CD7+	CD26+	CD28+	CD73+	CD27+		CD103 Int										

10

20

30

40

50

クラスター	早期に 活性化?	クラスターを区別するマーカー									
		PD- 1+ CD 127+	Eom es+ CD 127+	2B4+ GzmB+	KLR GI+	Gzm M+	Gzm K+	Tbet +	CD 127+ Int	CD 26 Int	CD 28 Int
c26											
c27	疲弊	PD- 1+ Eom es+	2B4 + CD 160+ TIGI T+	GzmB+	Tox+	Gzm K+					
c28	軽度の疲弊	PD- 1+ CD 39+	PD- 1+ CD 39+	Cd39+	Ki67 +	CD 38- CD 39-	CTL A4+	CD 103+	CD 200 R+	TIM 3+	LA G3+ CD 28+
c29	重度の疲弊	PD- 1+ Eom es+	2B4 + CD 160+ TIGI T+	GzmB+	Tox+	CD 38+	Gzm K+	Ki67 +	HLA- DR+	CXC R5+	PD- 1+ CD 39+
c3	重度の疲弊	PD- 1+ Eom es+	2B4 + CD 160+ TIGI T+	GzmB+	Tox+	Gzm K-					
c4	疲弊	PD- 1+ Eom es+	2B4 + CD 160+ TIGI T+	GzmB+	Helio s+	CD 16+	Perf +	CD 57+	PD- 1+ Int	Ki67	

10

20

30

40

50

クラスター	病態	クラスターを区別するマーカー											
		HGI I	Eom es	GzmB- CD	CD 160	2B4 +	Tbet +	Fox- Int	TIGI T+	CD 200 R+	CD 39+	Pige r2 Int	
c5													
c7	早期に 活性化?	PD- I- CD 127+	CD 127+	CD 7 Int	CD 26+	CD 28+	CD 27+	TIGI T+					
c9	重度の疲弊	HGI I	Eom es	GzmB- CD	CD 160	2B4 +	Tbet +	Fox +		CD 16+	CD 57+	Perf +	Gz mB +
c6	エフェクター/ EM	Gzm K+	Gzm B Int	Tbet Int	Eome s Int	Gzm M Int	PD- I Int						
c8	エフェクター/ EM	Gzm K+	Tbet Int	Eomes Int	Gzm M Int	PD- I Int	PD- I+ CD 127+	CD 27+		CD 28+	CCR 7+	TCF I+	

【 0 3 2 7 】

表 4 の 続 き

10

20

30

40

50



クラスター	特徴	存在量 (-,+,++,+++)	疲労 スコア (0,1,2,3)	Corr Viral Load	Corr CD4 counts	Recover w ART	HIV	Lung Ca
c1	疲労 (IL-10+)	2	2	Y	N	ND	-	-
c10	エフェクターメモリー(EM)/ EM CD45RA+ (EMRA)	0	0	N	Y	-	-	+
c11	エフェクター/ 組織レジデントメモリー	1	1	Y	Y	+	-	++
c12	不明確	0	0	N	Y	-	-	-

10

20

30

40

50

クラスター	特徴	存在量 (-,+,++,+++)	疲労 スコア (0,1,2,3)	Corr Viral Load	Corr CD4 counts	Recover w ART	HIV	Lung Ca
c13	ナイーブ	0	N	N	N	+	-	-
c15	セントラルメモリー (CM) またはナイーブ	0	Y	N	N	+	++	-
c16	軽度の疲労	2	N	N	Y	-	+/+	-
c17	早期に活性化?	0	Y	N	N	-	-	-
c18	組織レジデントメモリー	0	Y	N	N	+	+	+++
c19	活性化/疲労	0	N	N	Y	+	+/+	-
c2	疲労	3	Y	N	N	+	+++	+
c21	セントラルメモリー (CM) またはナイーブ	0						
c23	エフェクターメモリー (EM)/ EM CD45RA+ (EMRA)	1	N	N	Y	-	-	+
c25	EM	0	N	N	Y	-	-	-
c26	早期に活性化?	0	Y	N	N	+	-	+
c27	疲労	2	Y	N	N	-	+	++
c28	軽度の疲労	1	Y	N	N	ND	-	+++
c29	重度の疲労	3	Y	N	N	+/+	++	++
c3	重度の疲労	3	Y	Y	Y	+	++	+
c4	疲労	2	Y	Y	N	+	++	+
c5	疲労	2	N	N	Y	-	++	+/+
c7	早期に活性化?	0	N	N	N	+	-	+
c9	重度の疲労	3	N	N	Y	+	++	+/+
c6	エフェクター/ GM	1	N	Y	Y	-	+	+
c8	エフェクター/ GM	1	N	Y	Y	-	+	+

【 0 3 2 8 】

(表5) 用いたマウスサイトメトリー試薬

10

20

30

40

50

用いたマス・サイトメトリー試薬			
チャンネル/アイソトープ	試薬/標的	クローン	ソース
89Y	CD45	HI30	Fluidigm
113 In	CD45RO	UCHL1	BD
115 In	CD57	TB01	Ebioscience
139 La	MM-DOTA L/D		In-house
140 etc	ビーズ		Fluidigm
141 Pr	CD3	UCHT1	Biolegend
142 Nd	CD26	BA5b	Biolegend
142 Nd	IFN-g	B27	Biolegend
143 Nd	CD4	RPA-T4	Biolegend
144 Nd	CTLA-4	BNI3	BD
145 Nd	CD19	HIB19	Biolegend
145 Nd	TNF	MAB11	Ebioscience
146 Nd	CD8	RPA-T8	Biolegend
147 Sm	CD45RA	H100	BD
148 Nd	CD7	eBio124- 1D1	Ebioscience
149 Sm	CD73	AD2	Biolegend
149 Sm	CCL3	MAB2701	R&D
150 Nd	CD127	HIL-7R- M21	BD
151 Eu	CD39	A1	Biolegend
152 Sm	グランザイム B	CLB- GB11	Novus
152 Sm	IL-2	MQ1- 17H12	Ebioscience
153 Eu	Tim-3	F38-2E2	DVS
154 Sm	グランザイム K	GM6C3	Santa Cruz
154 Sm	XCL1	MAB6951	R&D
155 Gd	CD27	L128	Fluidigm
156 Gd	Helios	22F6	Biolegend
157 Gd	Ki-67	B56	BD
158 Gd	PD-1	EH12.2H7	Fluidigm
159 Tb	CCR7	G043H7	Fluidigm
160 Gd	Tbet	4B10	Fluidigm
161 Dy	CD28	CD28.2	Biolegend
162 Dy	FoxP3	PCH101	Fluidigm
162 Dy	IL-21	3A3-N2	Biolegend
162 Dy	Gzm M	4B2G4	Bovenschen lab

10

20

30

40

50

163 Dy	テトラマーーストレプトアビジン		NIH core / Newell lab
163 Dy	ICOS	C398.4A	Biolegend
163 Dy	TCF1	7F11A10	Biolegend
164 Dy	テトラマーーストレプトアビジン		NIH core / Newell lab
164 Dy	CXCL10	J034D6	Biolegend
165 Ho	Eomes	WD1928	Ebioscience
166 Er	CD200R2	OX-108	Ebioscience
166 Er	パーフォリン	B-D48	Abcam
166 Er	Areg	pAB-1	ThermoFisher
167 Er	CD38	HIT2	Fluidigm
168 Er	TOX	Rea473	Miltenyi
169 Tm	TIGIT	MBSA43	Ebioscience
170 Er	CXCR5	RF8B2	BD
171 Yb	2B4	C1.7	Biolegend
172 Yb	CD160	BY55	Biolegend
173 Yb	KLRG1	13F12F2	Pircher lab
173 Yb	HLA-DR	L243	Biolegend
174 Yb	テトラマーーストレプトアビジン		NIH core / Newell lab
174 Yb	CD103	Ber-ACT8	Biolegend
174 Yb	IL-10	JES3-9D7	Biolegend
175 Lu	LAG-3	17B4	Enzo
176 Yb	Ptger2	AB9472	EMD
176 Yb	CD36*	5-271	Biolegend
191/193	イリジウム		Fluidigm
195 Pt	シスプラチン		Fluidigm
209 Bi	CD16	3G8	Fluidigm

【 0 3 2 9 】

( 表 6 ) プライマー

10

20

30

40

50

プライマー名	SEQ ID NO	配列
TCF プライマー対 1 順方向	1	AGCAGACCCGAGACGTAGTA
TCF プライマー対 1 逆方向	2	AGCATCAAAGCCCACTTGAA
TCF プライマー対 2 順方向	3	AACCCAGCAAGAAATAGCG
TCF プライマー対 2 逆方向	4	TGGGAATACTACGTCTCGGGT
CD8 プライマー対 1 順方向	5	GGCGGATGTCACTGTGGTTA
CD8 プライマー対 1 逆方向	6	GAGGTGAGGGGAATGCCAAA
CD8 プライマー対 2 順方向	7	TGGGCTACAGAAAGCAAGCA
CD8 プライマー対 2 逆方向	8	AGGTGAGGGGAATGCCAAAG
PD1 プライマー対 順方向	9	ACCTGTTTTGTTCTGTACGCTC
PD1 プライマー対 逆方向	10	TGCATGTTCTGTTATCTCAATGTTCT
Cd3g Pr プライマー対 1 順方向	11	CTCCACCCAGCATGCATTGA
Cd3g Pr プライマー対 1 逆方向	12	GGCGGAGACACCTGGTATTG
Cd3g Pr プライマー対 2 順方向	13	TGGGACTCTGAGTAGAGGCA
Cd3g Pr プライマー対 2 逆方向	14	CCTGCTGCCCACACTCTAC
Cd3e UTR プライマー対 1 順方向	15	TCTCATCCTCACTCCCAGCA
Cd3e UTR プライマー対 1 逆方向	16	GTCTGAAGCCCCAAGCAGTA
Cd3d UTR プライマー対 2 順方向	17	GCTCTGGGTTCTCTCTCCT
Cd3d UTR プライマー対 2 逆方向	18	CCAGACACTGGAGGCTATCG
Ifng プライマー対 1 順方向	19	CCCCACCTATCTGTCACCA
Ifng プライマー対 1 逆方向	20	GAAGGCTCCTCGGGATTACG
Ifng プライマー対 2 順方向	21	CGTAATCCCGAGGAGCCTTC
Ifng プライマー対 2 逆方向	22	GTGTCTTCTCTAGGTCAGCCG
Il2ra プライマー対 1 順方向	23	GCTCTGAACACAGAGGTGTGA
Il2ra プライマー対 1 逆方向	24	CTCTTCAAGGCACAGCCCAG
Il2ra プライマー対 2 順方向	25	CTCCAAGCTAATGGTGTGTTGC
Il2ra プライマー対 2 逆方向	26	AGCTTAACCACATGCCACA
Colla2 プライマー対 1 順方向	27	GCCCTCCCTTCCAAAAAGA
Colla2 プライマー対 1 逆方向	28	GGTCCTAGGATGGAGGCTGA
Colla2 プライマー対 2 順方向	29	GCTGCGCTTCTGAAGACTA
Colla2 プライマー対 2 逆方向	30	CAAAGACAGCCGCTTTGGG
Tinagl1 プライマー対 1 順方向	31	TGGTGACTCTCCTCCCTCAG
Tinagl1 プライマー対 1 逆方向	32	AAAACAAGGCCAGAGAGGG
Tinagl1 プライマー対 2 順方向	33	ACATGTTAGCACAGCCTCCC
Tinagl1 プライマー対 2 逆方向	34	GCTTCGTCTCACCTGCAGAA

10

20

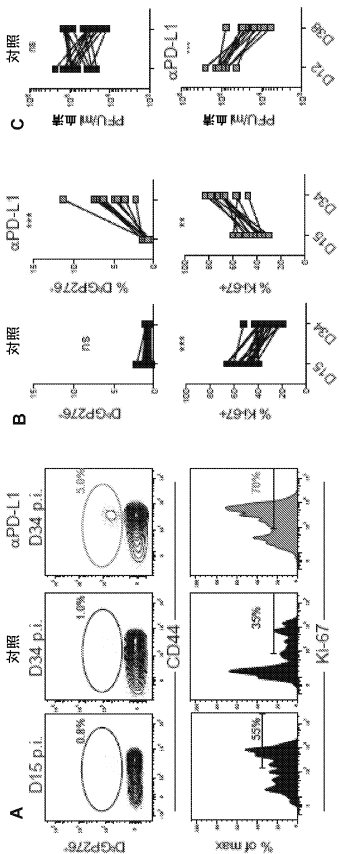
30

40

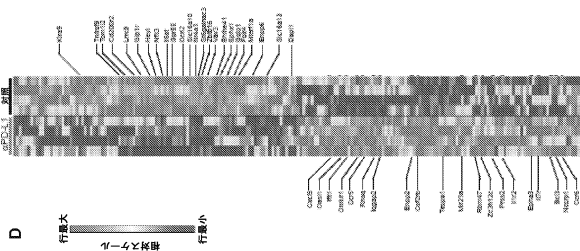
50

【図面】

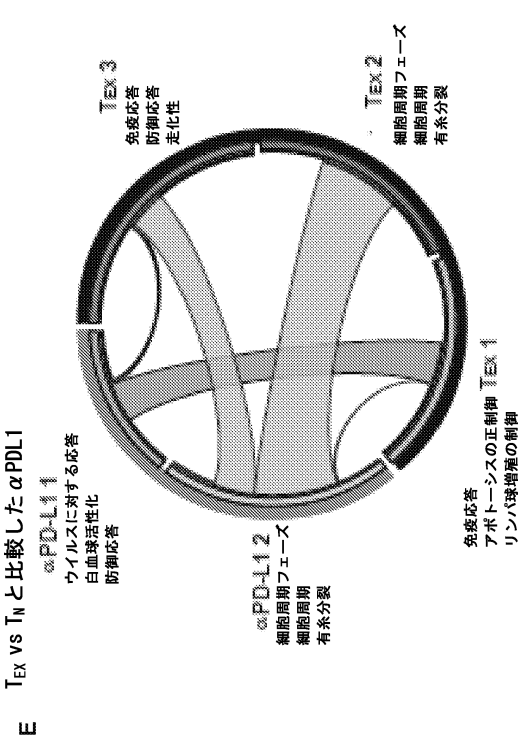
【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



【図 1 - 3】



【図 1 - 4】

LEM #:	記述	P値	FDR
Tex 2 vs Tex 3	免疫応答	1.4E-09	2.0E-09
Tex 2 vs Tex 3	防御応答	1.3E-07	2.2E-07
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	3E-08	4.9E-08
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期フェーズ	8.4E-74	6.3E-71
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期	8.7E-74	1.3E-70
Tex 2 vs Tex 3	有糸分裂	1.3E-60	1.9E-57
Tex 2 vs Tex 3	免疫応答	6.3E-08	8.4E-05
Tex 2 vs Tex 3	防御応答	3.3E-07	5.0E-04
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	0.0E-04	1.5E-01
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期フェーズ	1.9E-02	2.0E-01
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期	4.0E-14	8.1E-11
Tex 2 vs Tex 3	有糸分裂	2.7E-09	4.1E-06
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	3.1E-09	5.0E-06
Tex 2 vs Tex 3	免疫応答	8.1E-10	1.0E-06
Tex 2 vs Tex 3	防御応答	6.7E-09	9.3E-06
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	8.0E-07	4.9E-04
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期フェーズ	3.1E-04	4.7E-01
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期	6.2E-01	8E-08
Tex 2 vs Tex 3	有糸分裂	1.4E-01	2.1E-08
Tex 2 vs Tex 3	免疫応答	0.0E-09	1.0E-05
Tex 2 vs Tex 3	防御応答	1.3E-07	2.0E-04
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	6.1E-04	0.0E-01
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期フェーズ	7.2E-10	1.1E-06
Tex 2 vs Tex 3	細胞周期	4.1E-04	6.2E-01
Tex 2 vs Tex 3	有糸分裂	1.33E-03	2.0E-03
Tex 2 vs Tex 3	免疫応答	0.0E-01	1E-07
Tex 2 vs Tex 3	防御応答	1.4E-07	2.0E-04
Tex 2 vs Tex 3	白血球活性化	2E-04	3E-01

E Tex vs Tex 3 と比較した αPD-L1

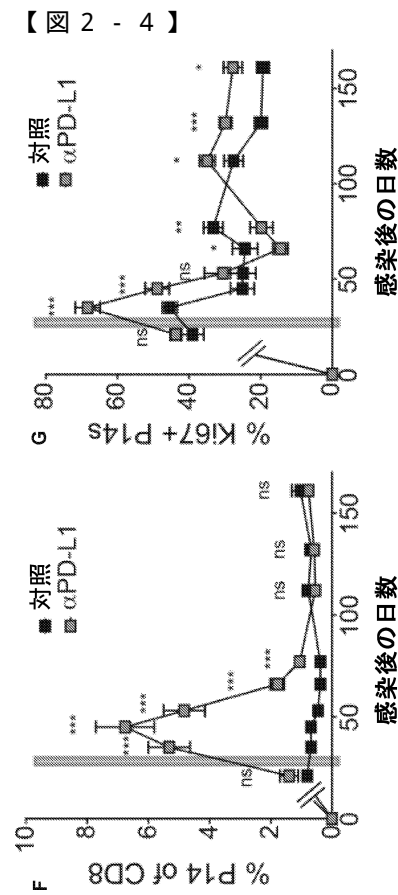
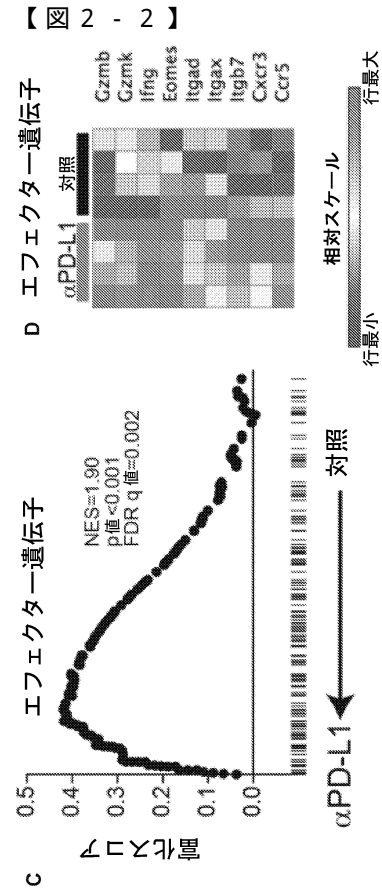
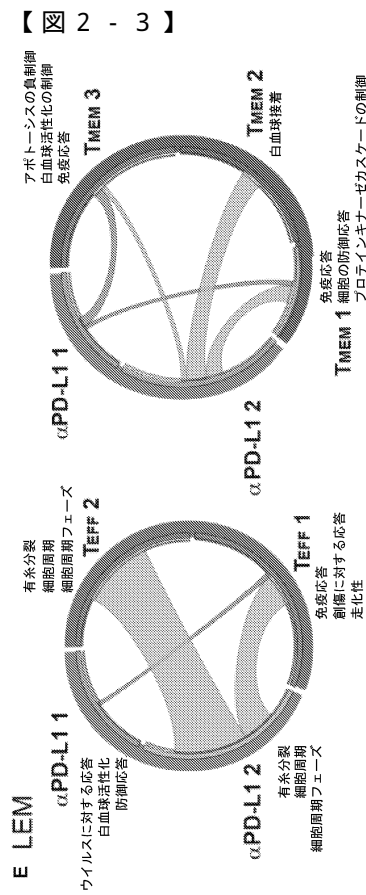
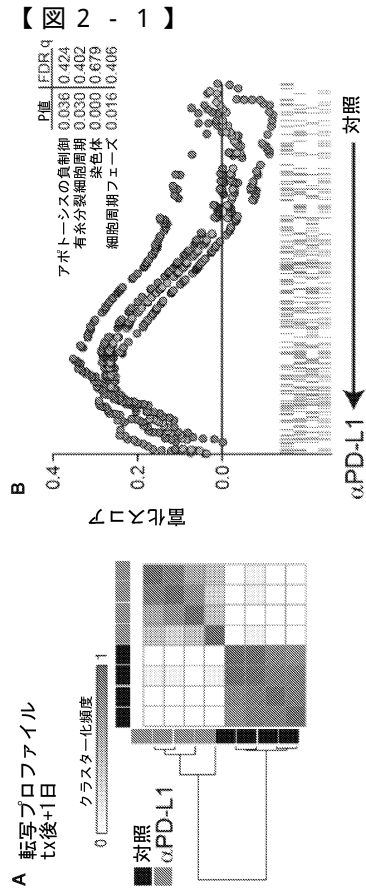
10

20

30

40

50



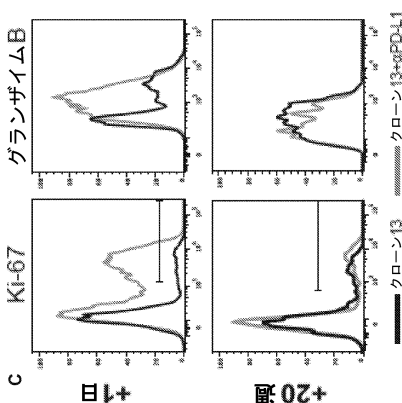
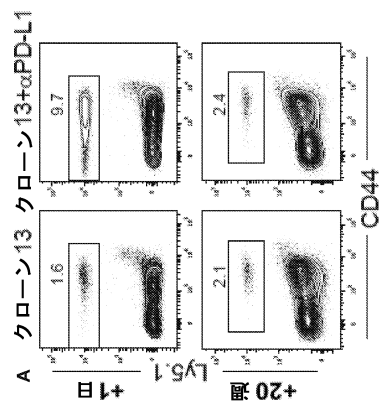
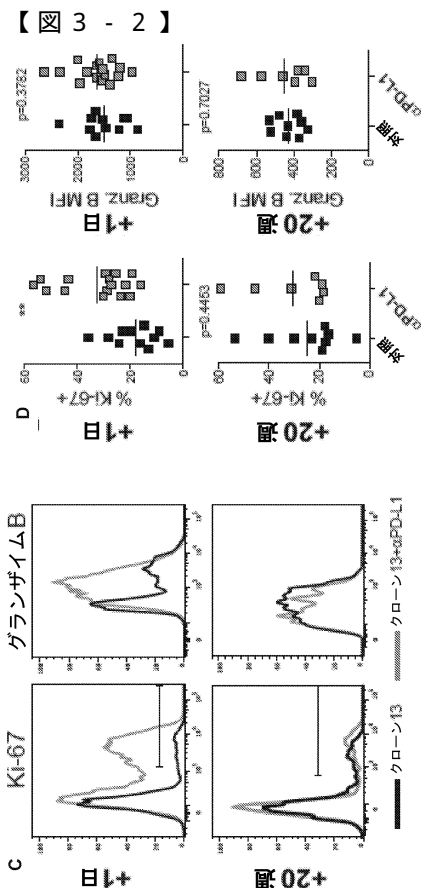
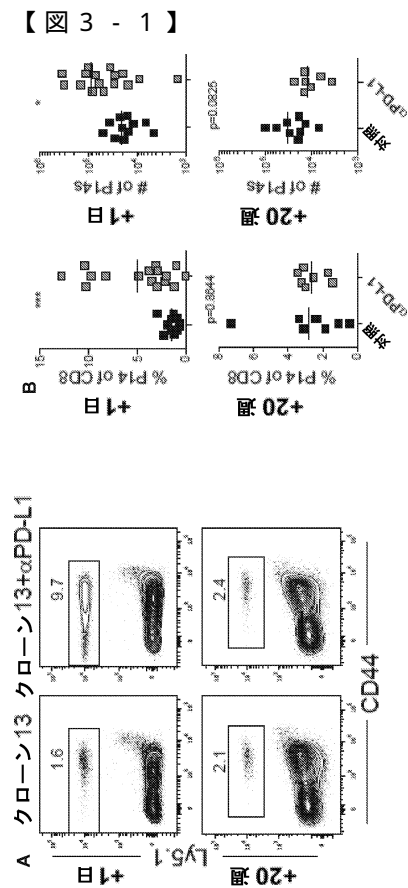
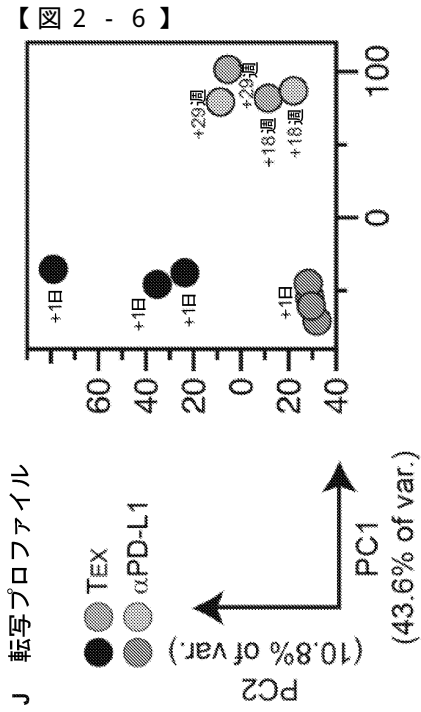
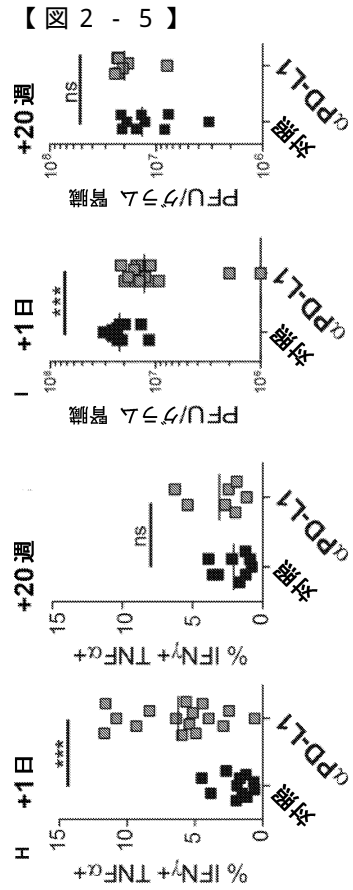
10

20

30

40

50



10

20

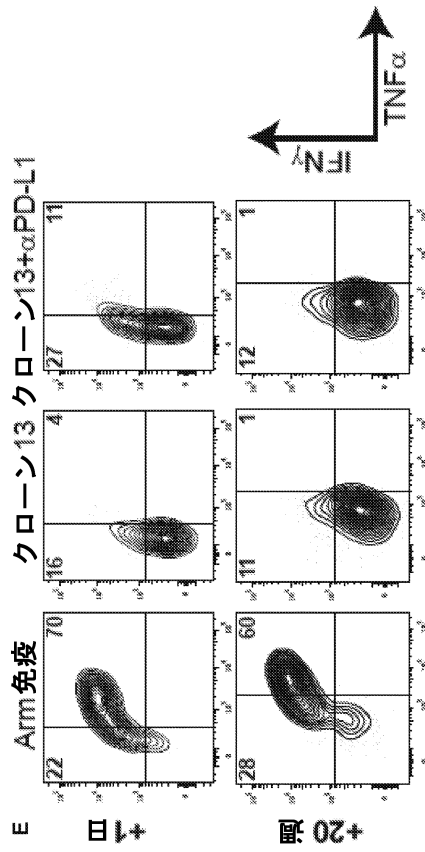
30

40

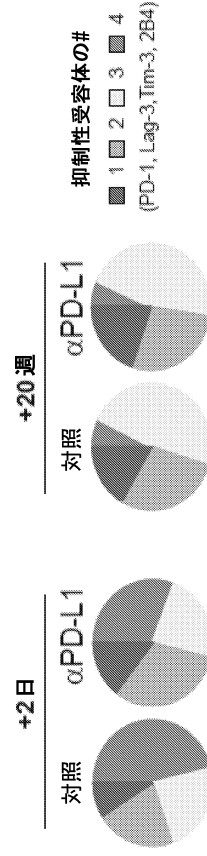
50



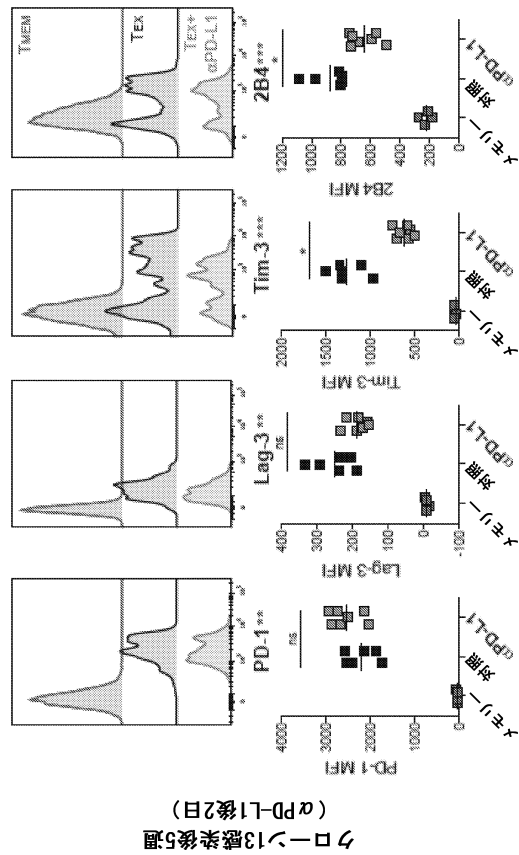
【図 3 - 3】



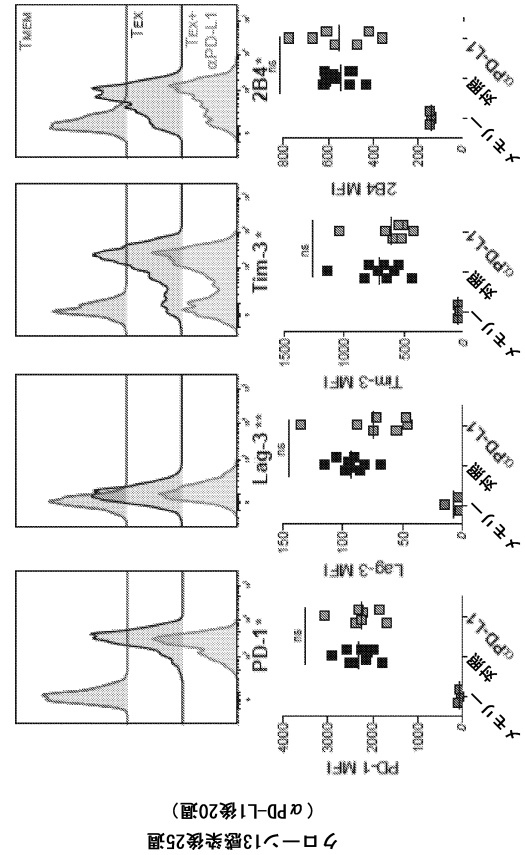
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

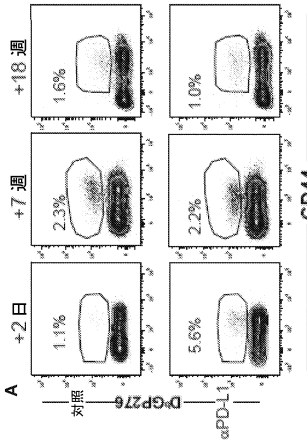
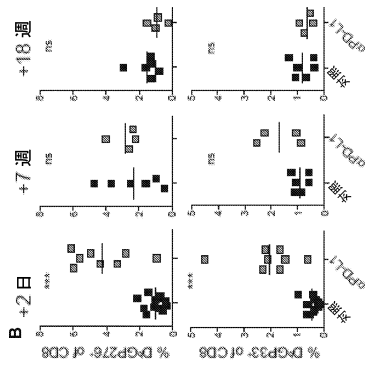
20

30

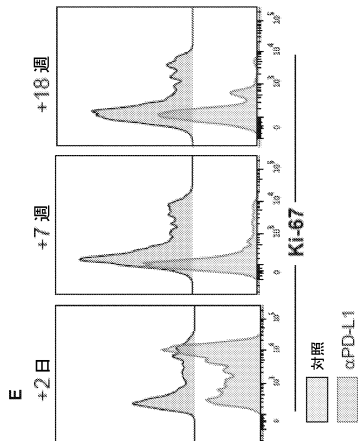
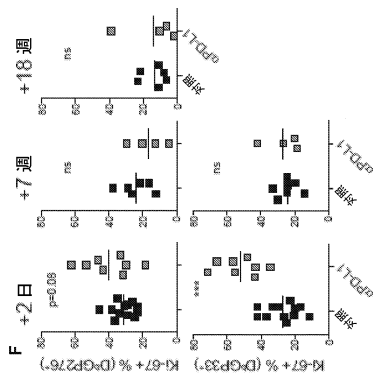
40

50

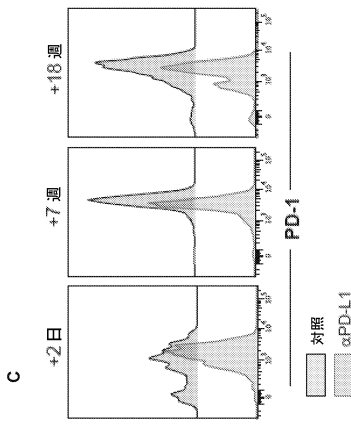
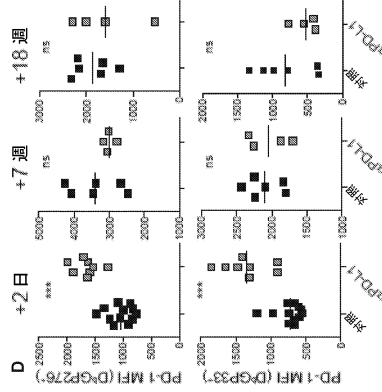
【図 5 - 1】



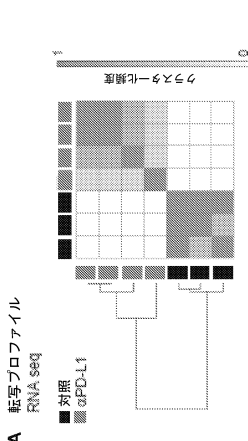
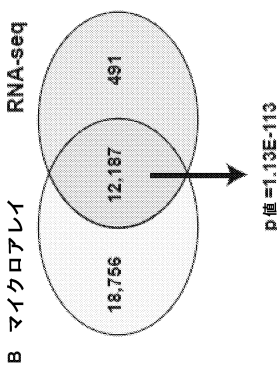
【図 5 - 3】



【図 5 - 2】



【図 6 - 1】



10

20

30

40

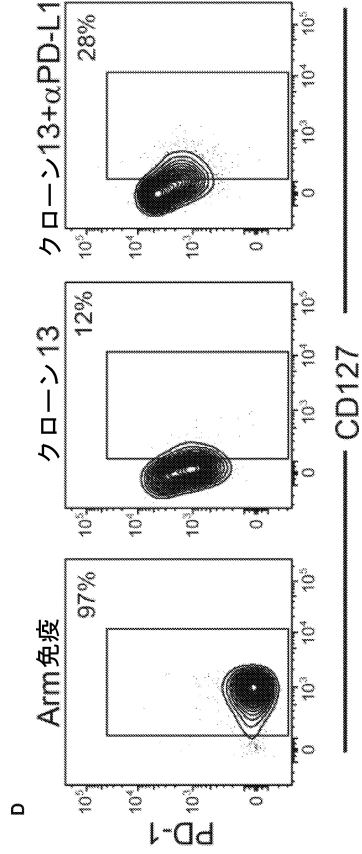
50



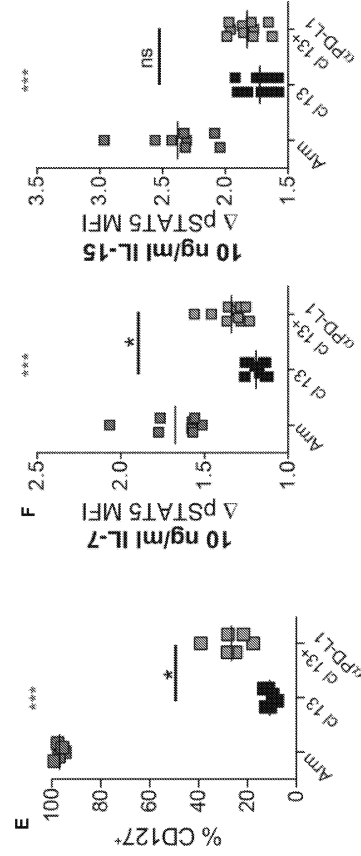




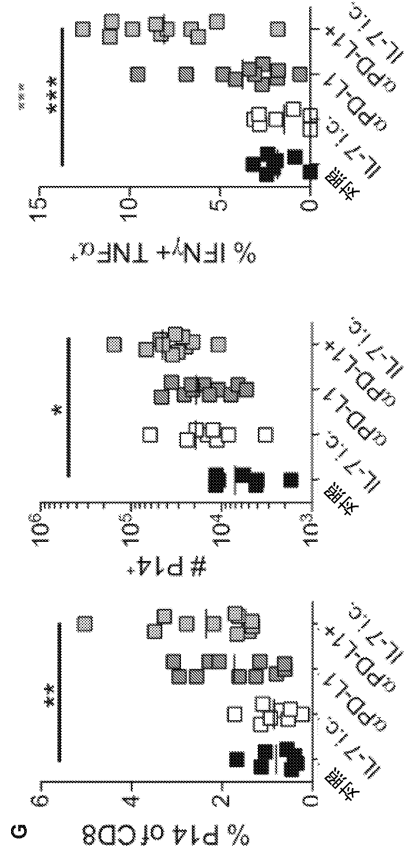
【図 9 - 2】



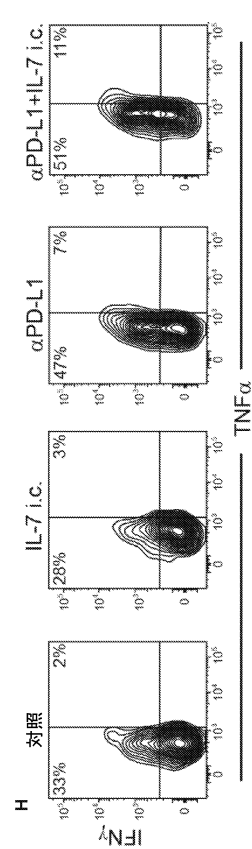
【図 9 - 3】



【図 9 - 4】



【図 9 - 5】



10

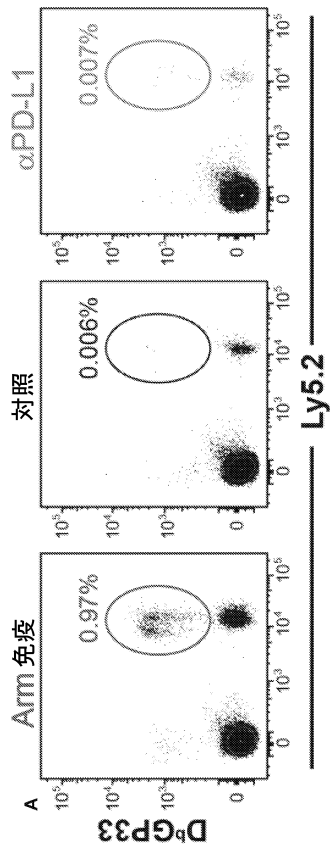
20

30

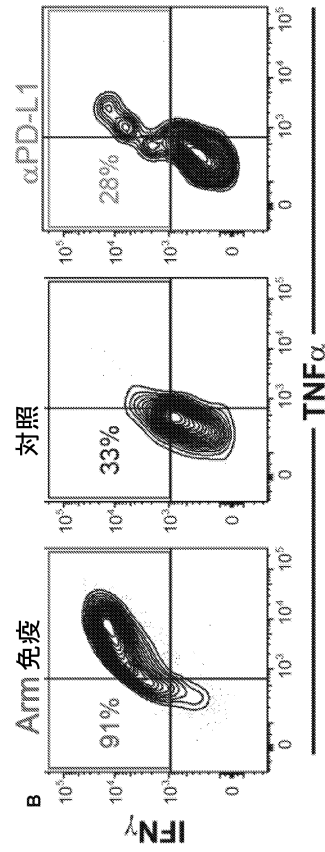
40

50

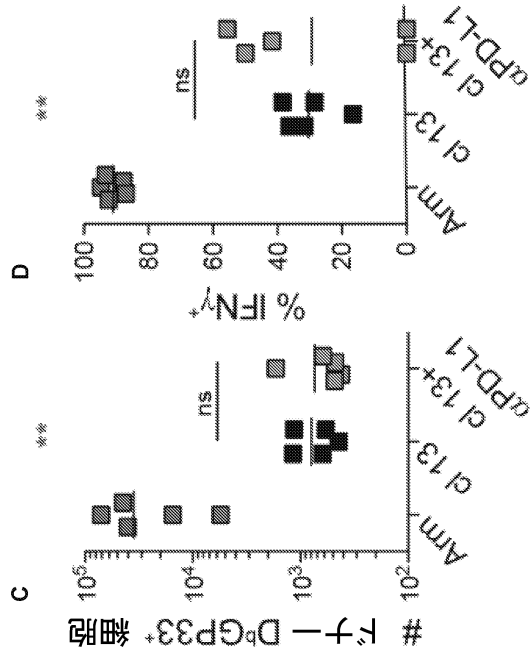
【図 10 - 1】



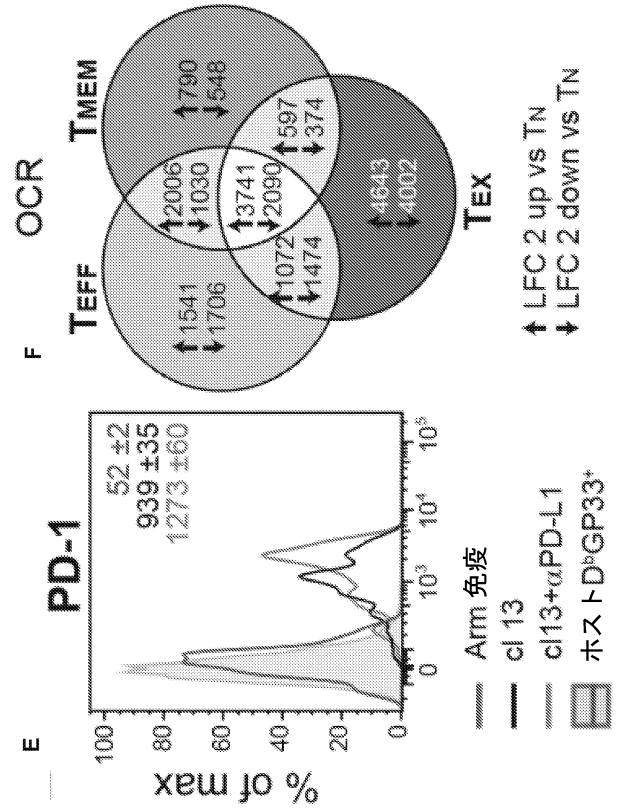
【図 10 - 2】



【図 10 - 3】



【図 10 - 4】



10

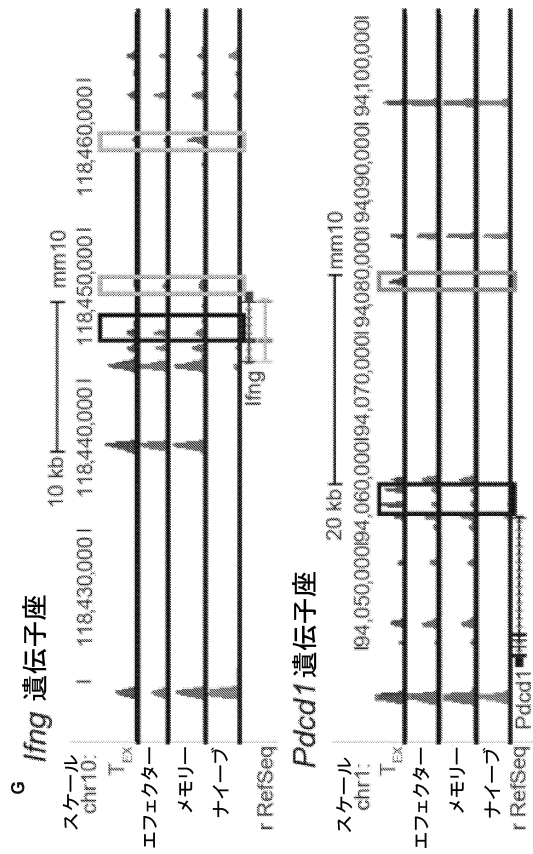
20

30

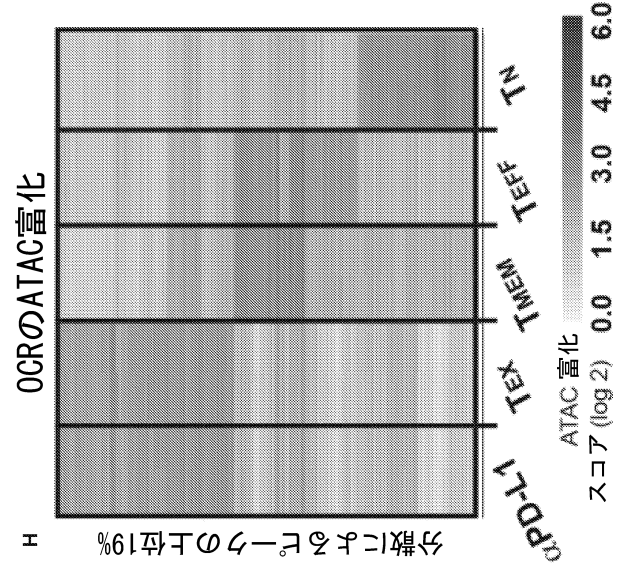
40

50

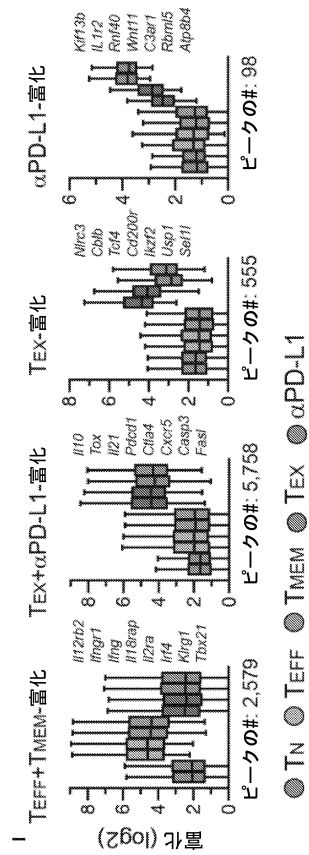
【図 10 - 5】



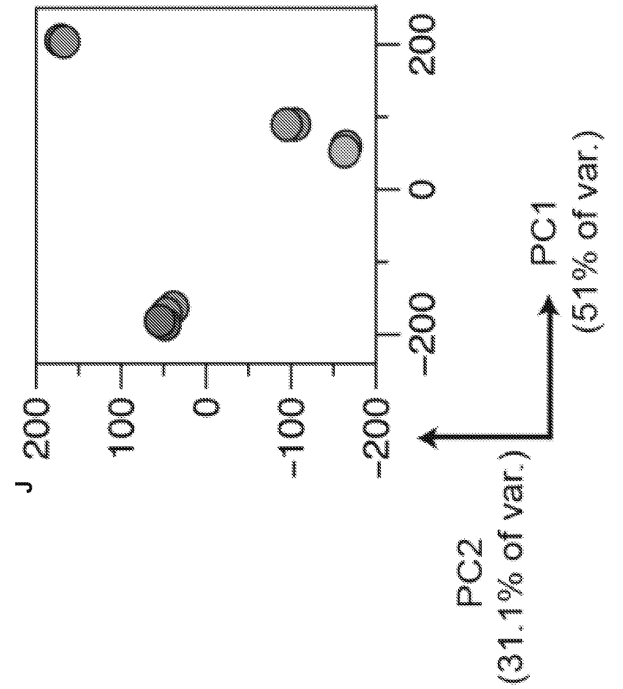
【図 10 - 6】



【図 10 - 7】



【図 10 - 8】



10

20

30

40

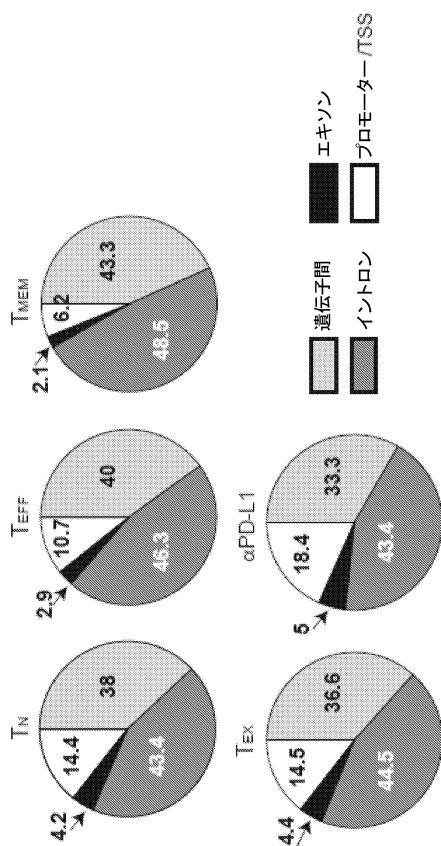
50



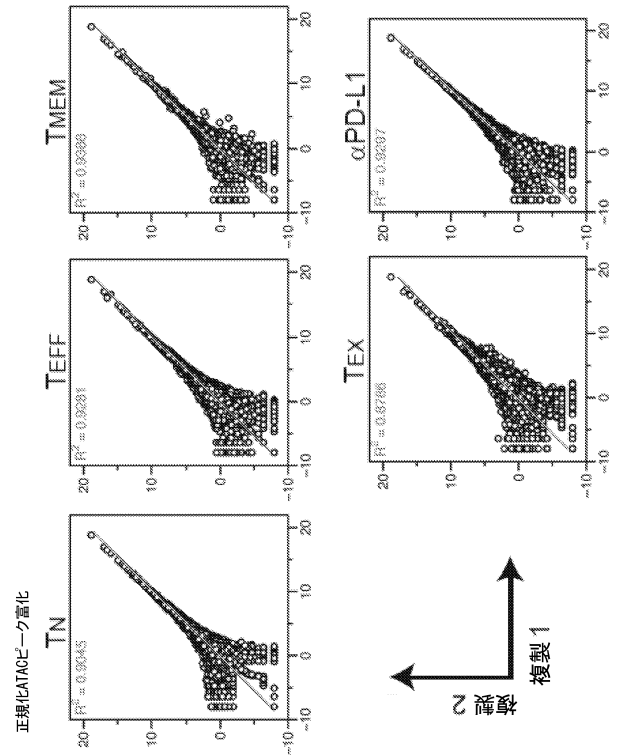
【図 1 1 A】

	ペアの読み全体	アラインされた数	アラインの割合(%)	ピークの# (MACS v1.4)
TN-1	21,580,793	19,895,761	92.19	47,245
TN-2	37,179,087	34,405,396	92.54	52,242
TEFF-1	52,854,827	47,732,769	90.31	64,351
TEFF-2	51,028,317	46,145,040	90.43	60,124
TMEM-1	61,364,436	42,757,634	69.68	58,448
TMEM-2	60,666,170	55,654,432	91.74	58,676
TEX-1	48,137,474	42,639,858	88.58	39,225
TEX-2	66,496,181	60,252,069	90.61	59,910
$\alpha$ PD-L1-1	49,545,282	44,790,886	90.40	55,036
$\alpha$ PD-L1-2	59,567,799	53,608,743	90.00	56,564

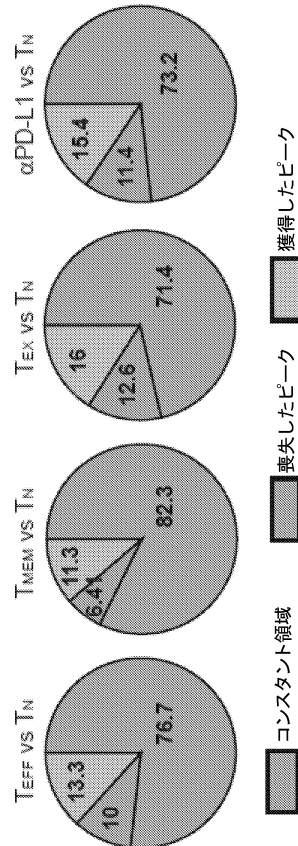
【図 1 2 A】

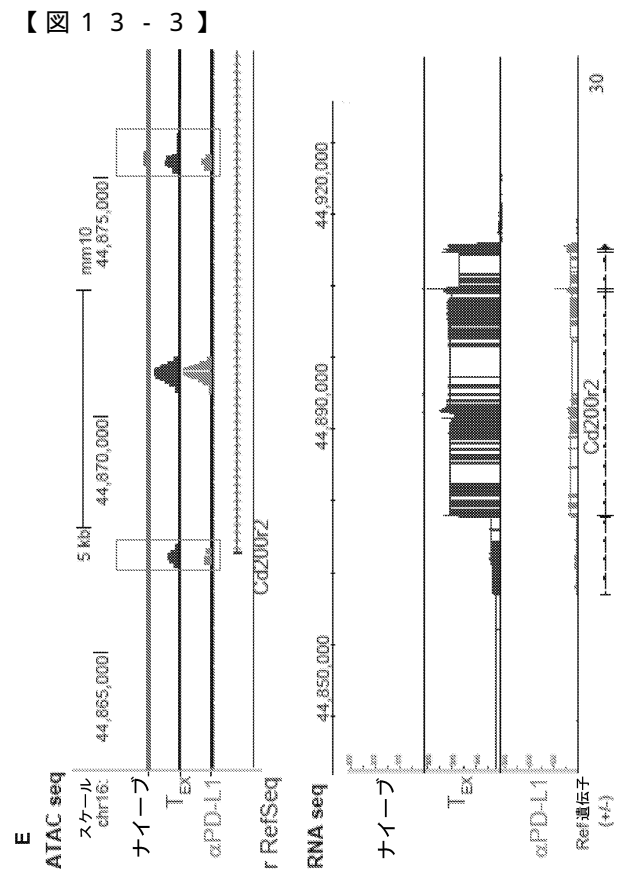
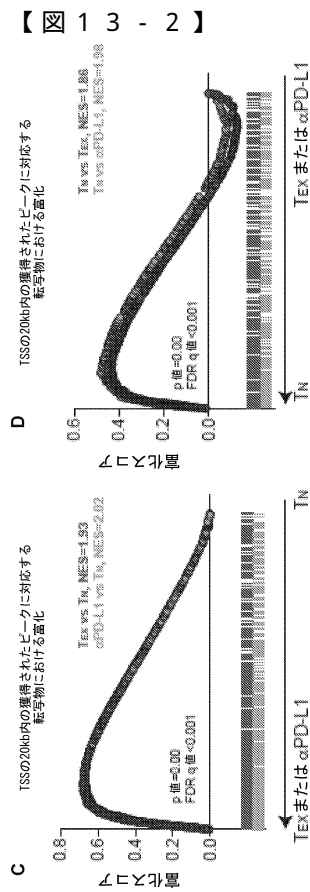
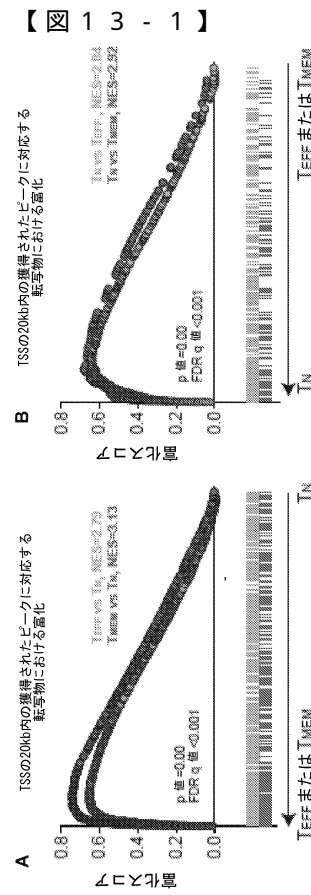
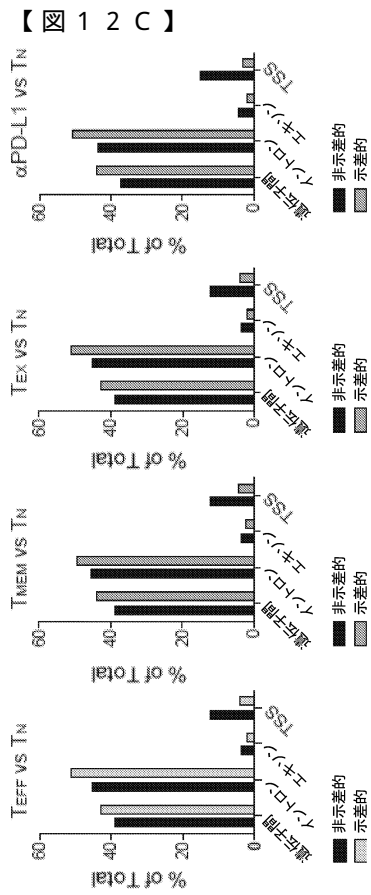


【図 1 1 B】



【図 1 2 B】





10

20

30

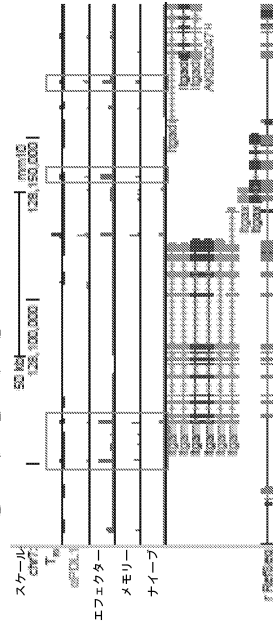
40

50

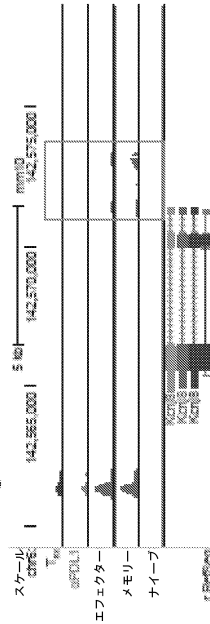


【図 15 - 4】

F *Itgam*, *Itgax*, *Itgad* TEFF-富化

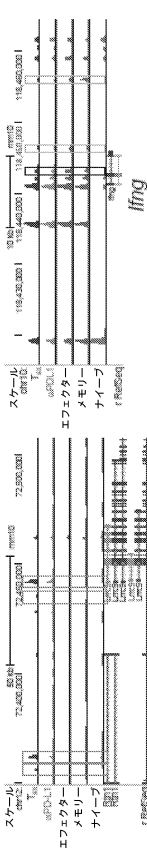


G *Kcnj8* TMEM-富化

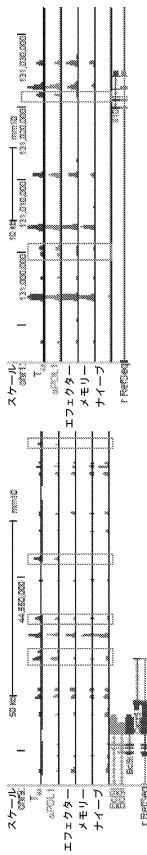


【図 16 - 1】

A *Lrrc9/Rtn1* TEX-富化



F *Il10* TEX+αPD-L1-富化

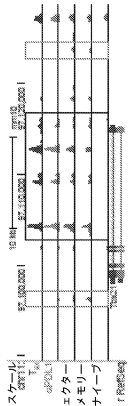


【図 16 - 2】

C *Pdcd1* TEX+αPD-L1-富化

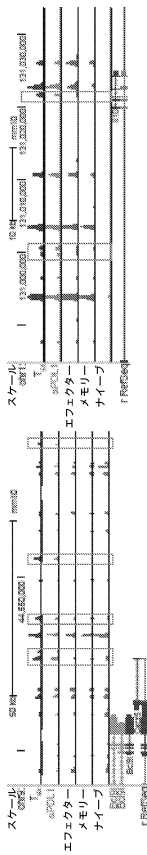


D *Tbx21* (T-bet)



【図 16 - 3】

E *Cxcr5* TEX+αPD-L1-富化



10

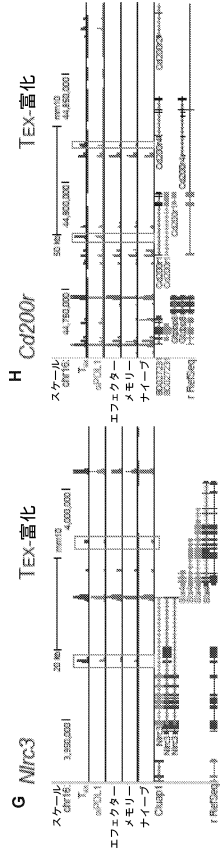
20

30

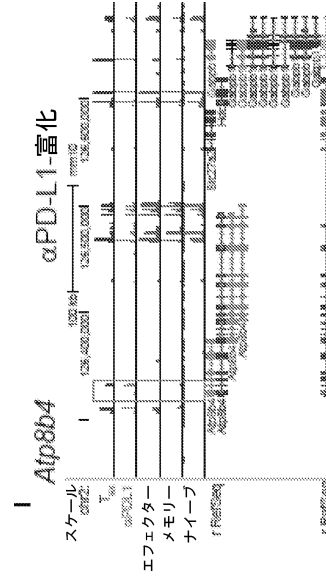
40

50

【図 1 6 - 4】



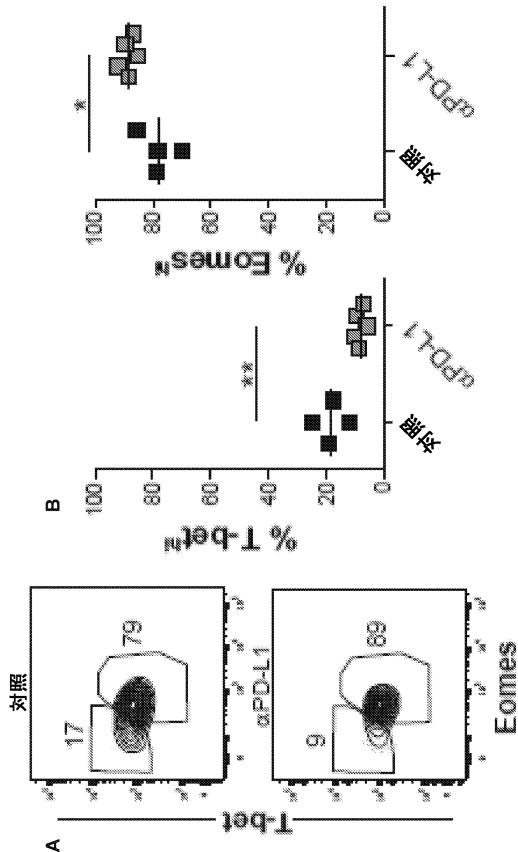
【図 1 6 - 5】



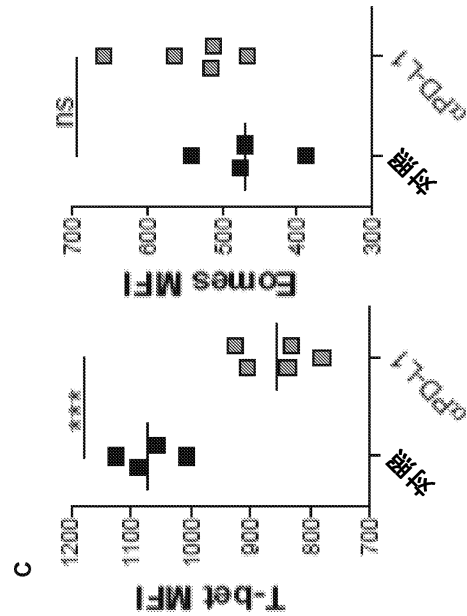
10

20

【図 1 7 - 1】



【図 1 7 - 2】

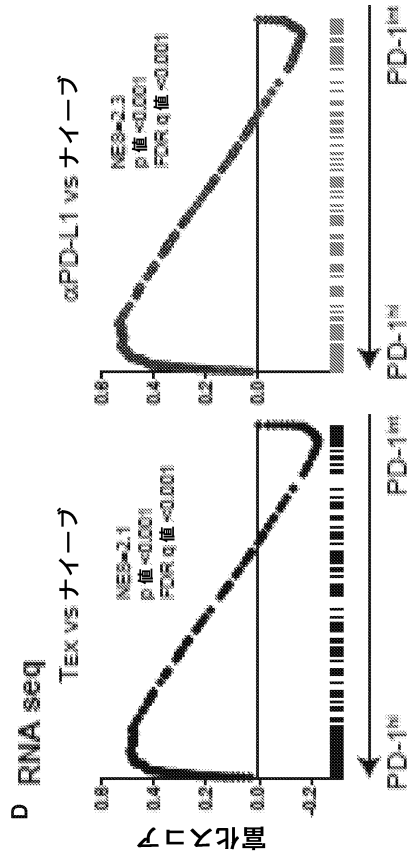


30

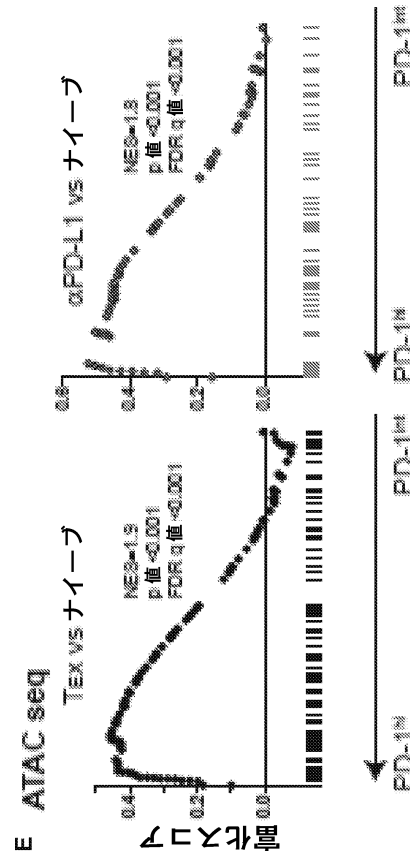
40

50

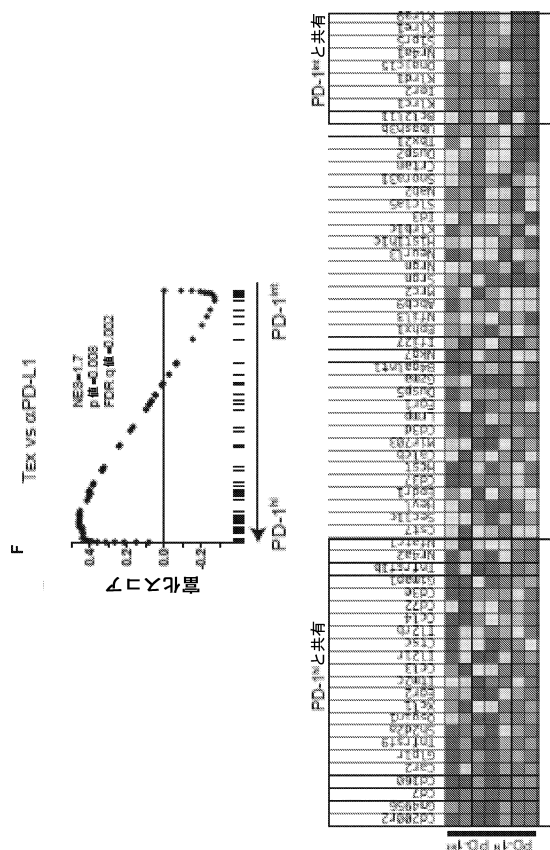
【図 17 - 3】



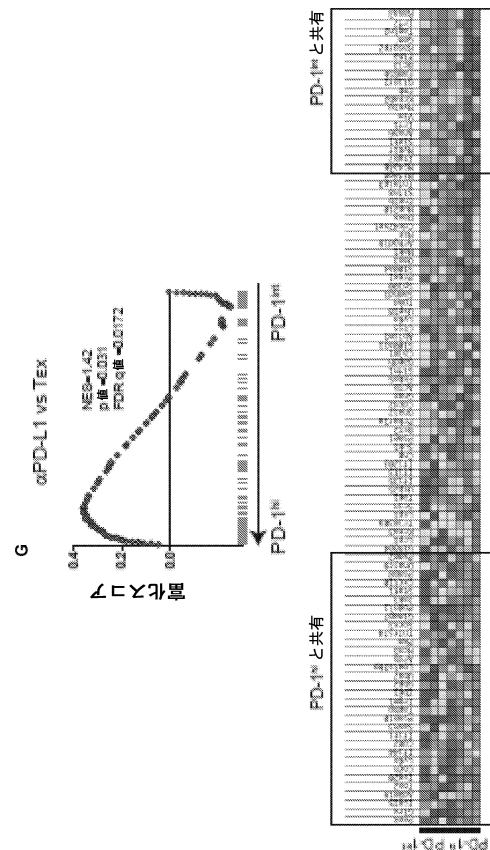
【図 17 - 4】



【図 17 - 5】



【図 17 - 6】



10

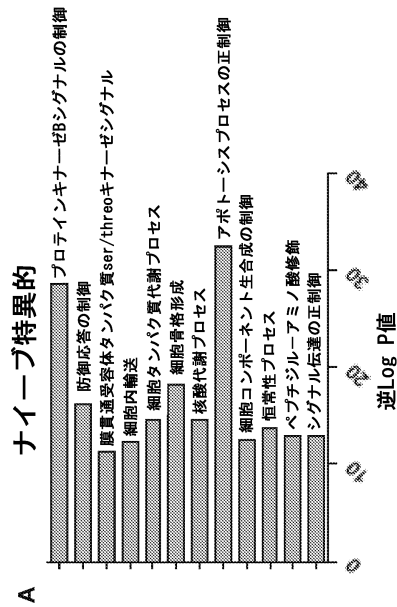
20

30

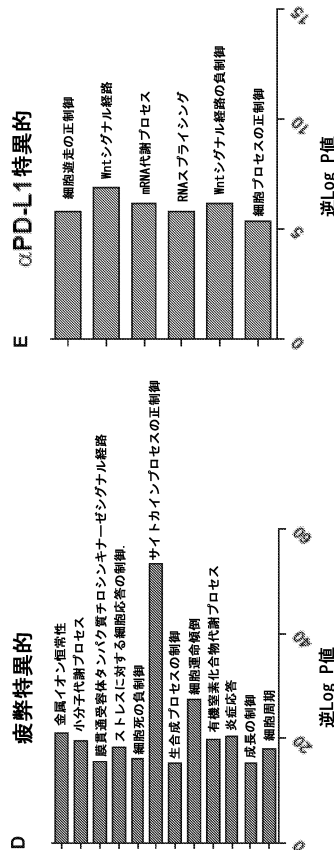
40

50

【図 1 8 - 1】



【図 1 8 - 3】

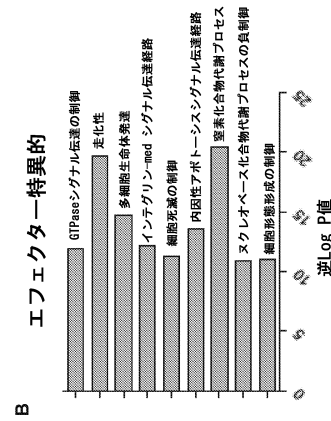
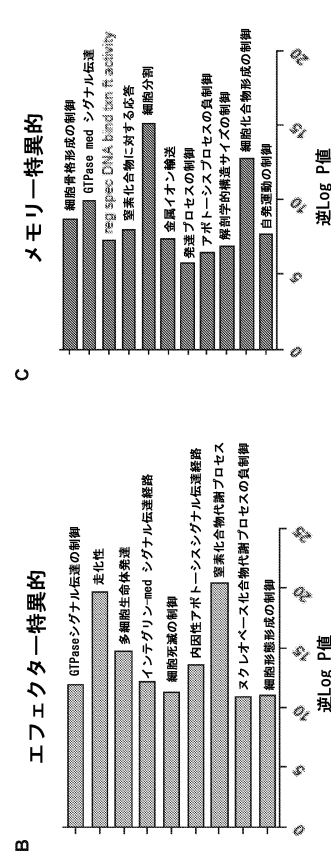


**E**

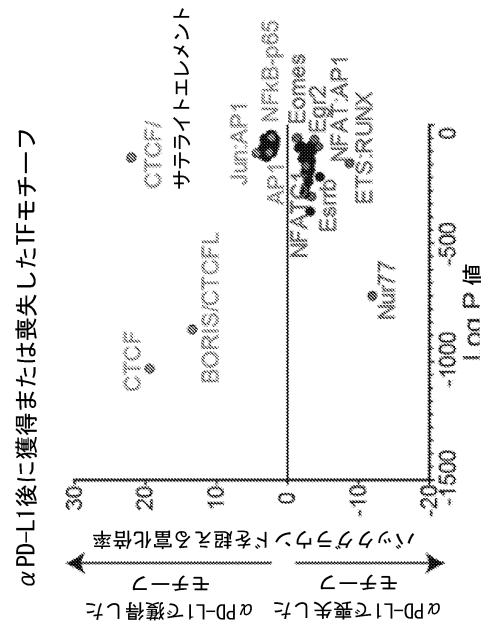
**αPD-L1特異的**

生物学的プロセス	逆Log P値 (概算)
細胞遊走の正制御	12
Wntシグナル経路	10
mRNA代謝プロセス	8
RNAスプライシング	7
Wntシグナル経路の負制御	6
細胞プロセスの正制御	5

【図 1 8 - 2】



【図 1 9 A】



10

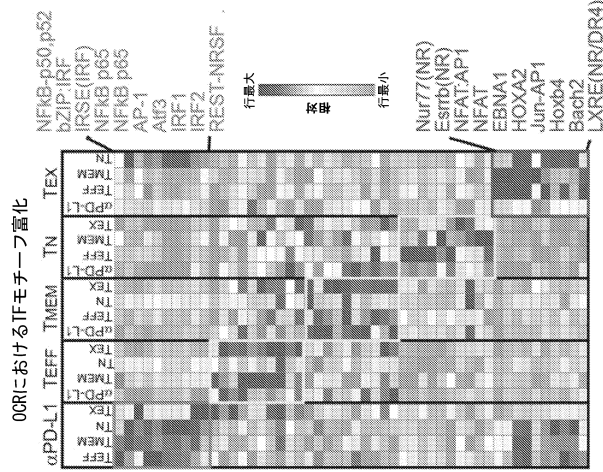
20

30

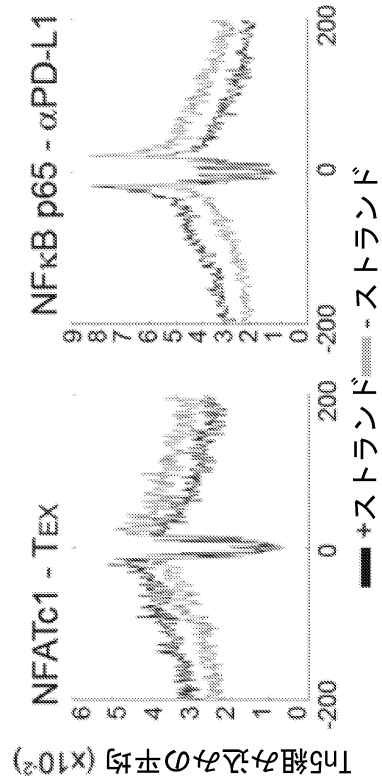
40

50

【 図 1 9 B 】



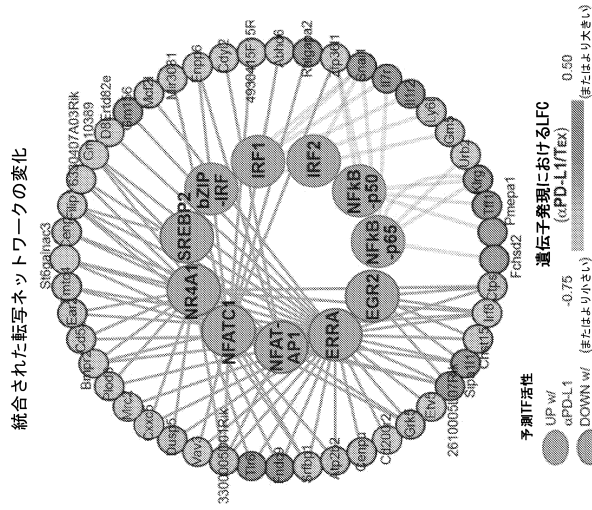
【図 19 C】



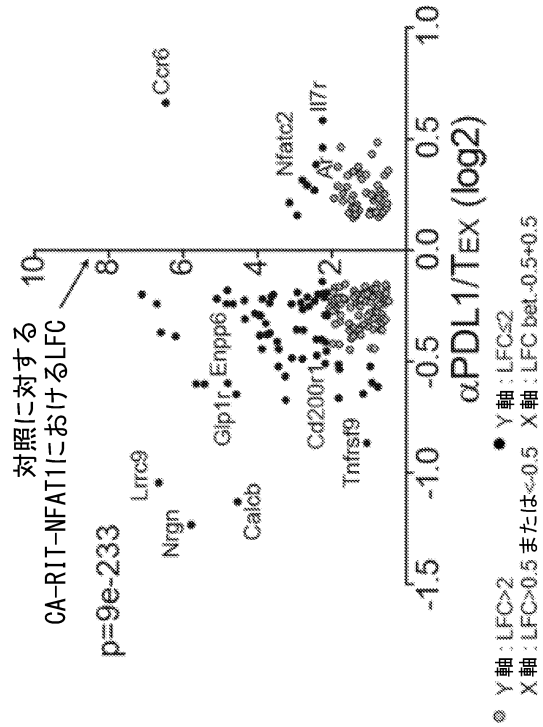
# TFフットプリンティング

Tn5組み込みの平均 ( $\times 10^{-2}$ )

【 図 1 9 D 】



【図 19 E】



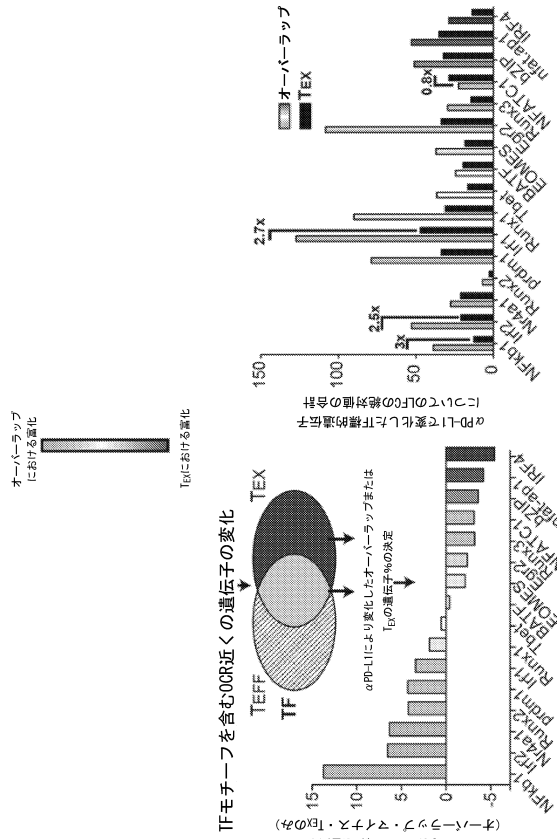
● 軸: LFC-2

Y軸:LFCS2

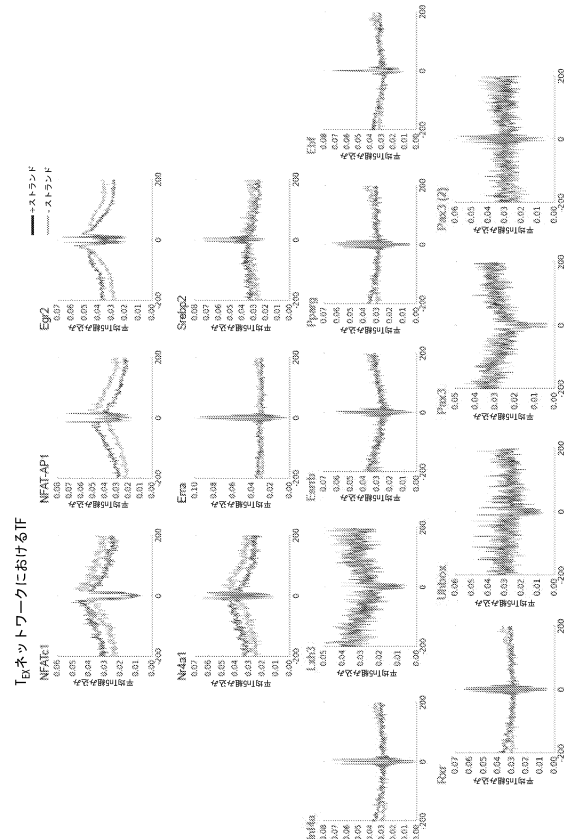
X軸: LFC>0.5または<0.5 X軸: LFCbet.0.5+0.5



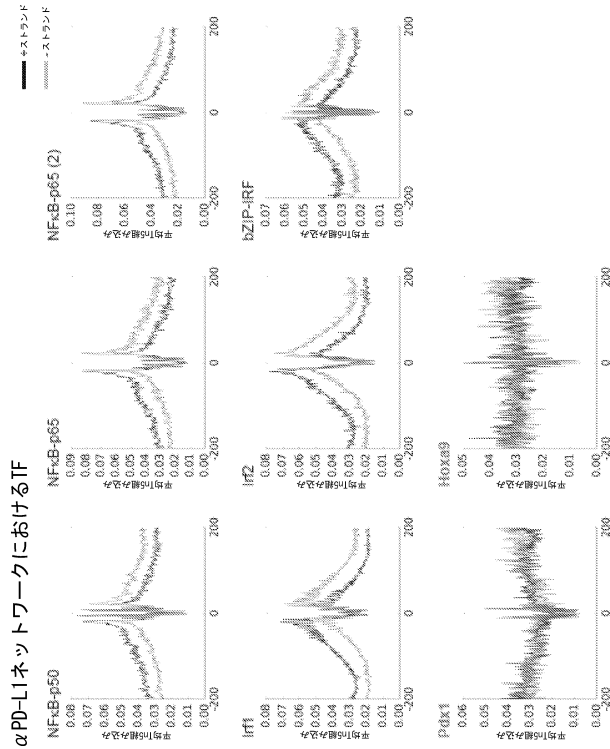
【 図 1 9 F 】



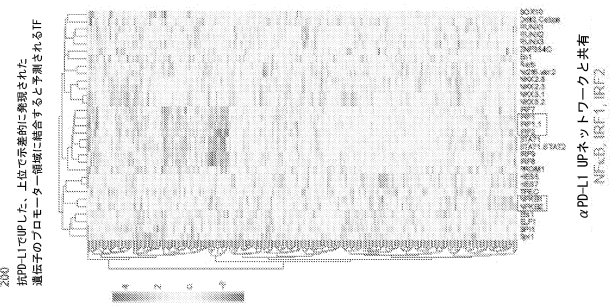
【 図 2 0 】



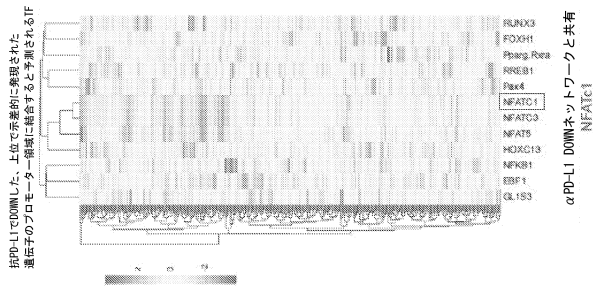
【 図 2 1 】



【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



【図 2 3 A】

MSKCC Keynote-001

特徴	N=18	N=18
年齢、年平均値 (範囲)	63.5 (30-75)	0%, n=0
ECOG PS 0/1	100% n=18	56% n=10
Known Brain mets	11% n=2	0% n=0
LDH >ULN	44% n=8	44% n=8
BRAF 変異	22% n=4	
- BRAF 処理	100% n=4	
抗CTLA4処理	89% n=16	

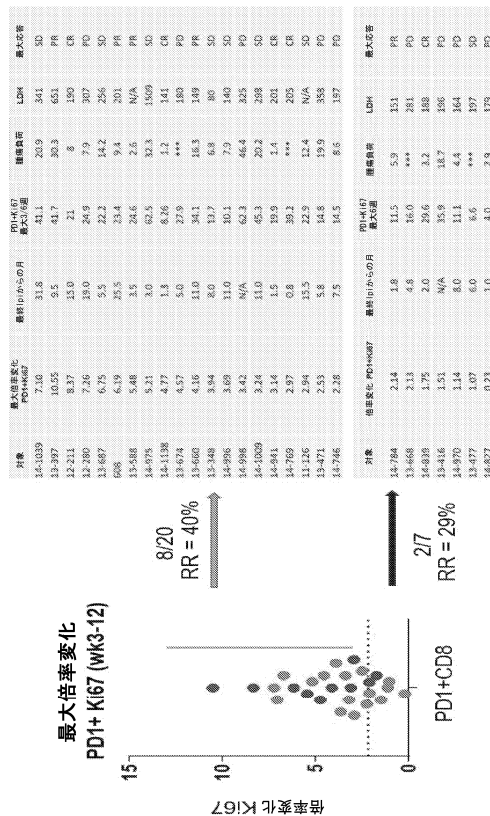
特徴	N=18	N=18
年齢、年平均値 (範囲)	63.5 (30-75)	0%, n=0
ECOG PS 0/1	100% n=18	56% n=10
Known Brain mets	11% n=2	0% n=0
LDH >ULN	44% n=8	44% n=8
BRAF 変異	22% n=4	
- BRAF 処理	100% n=4	
抗CTLA4処理	89% n=16	

Penn EAP

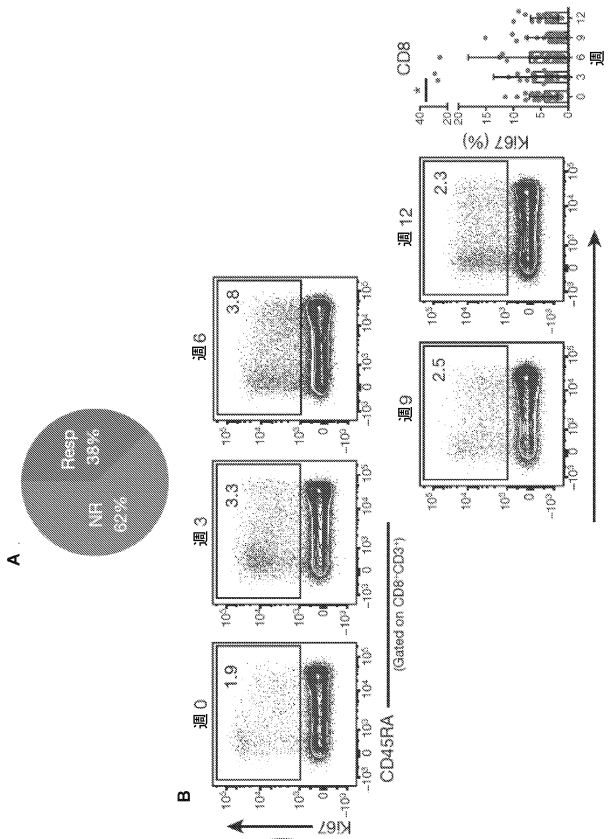
特徴	N=29	N=29
年齢、年平均値 (範囲)	57 (25-82)	17% n=5
ECOG PS 0/1	97% n=28	21% n=6
Known Brain mets	45% n=13	24% n=7
LDH >ULN	62% n=18	38% n=11
BRAF 変異	28% n=8	
- BRAF 処理	75% n=6	
抗CTLA4処理	100% n=28	

特徴	N=29	N=29
年齢、年平均値 (範囲)	57 (25-82)	17% n=5
ECOG PS 0/1	97% n=28	21% n=6
Known Brain mets	45% n=13	24% n=7
LDH >ULN	62% n=18	38% n=11
BRAF 変異	28% n=8	
- BRAF 処理	75% n=6	
抗CTLA4処理	100% n=28	

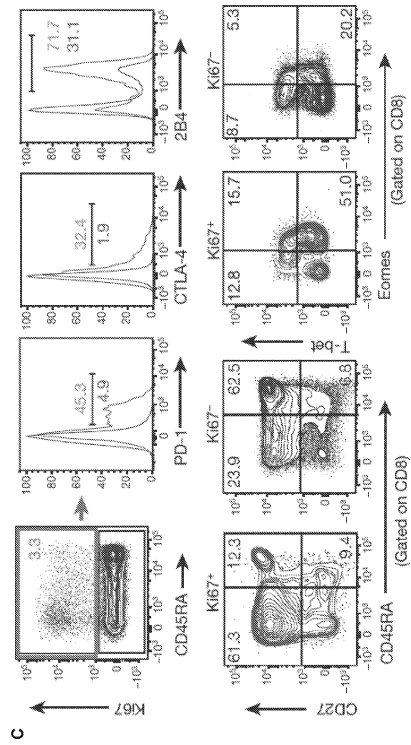
【図 2 3 B】



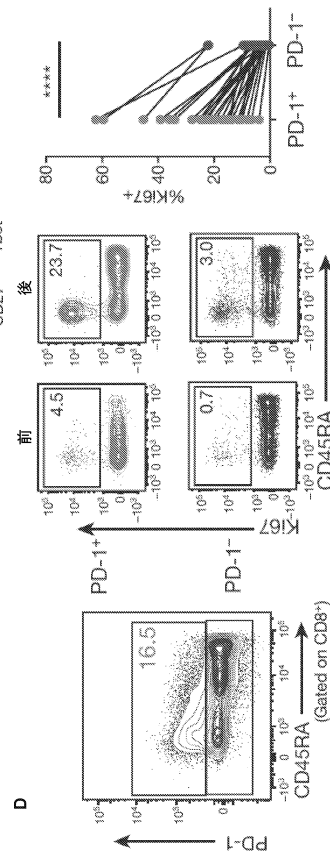
【図 2 4 - 1】



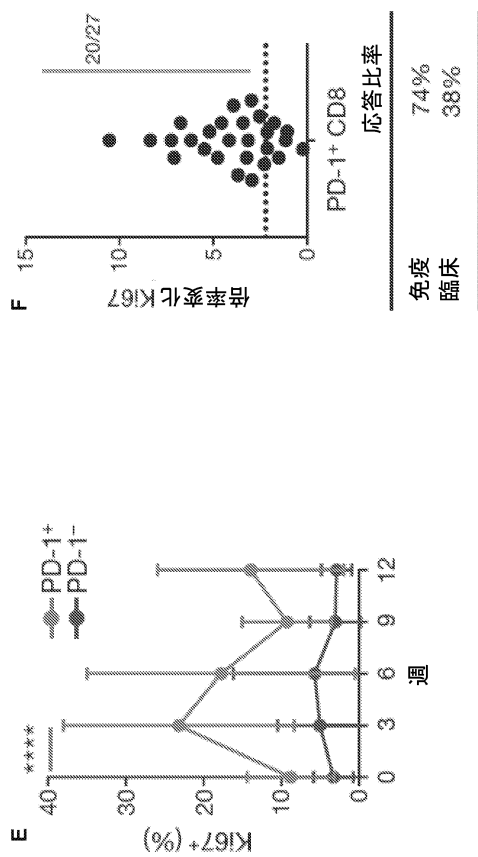
【図 2 4 - 2】



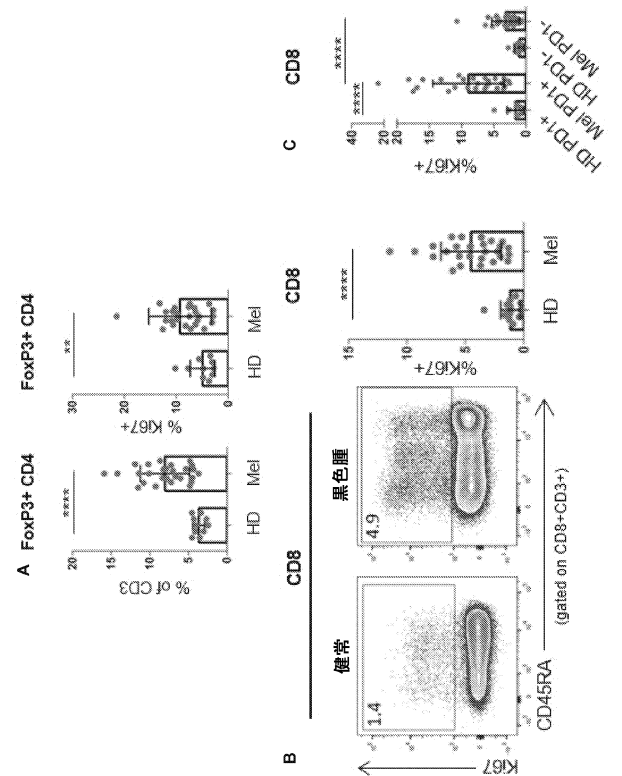
【図 2 4 - 3】



【図 2 4 - 4】



【図 2 5 - 1】



10

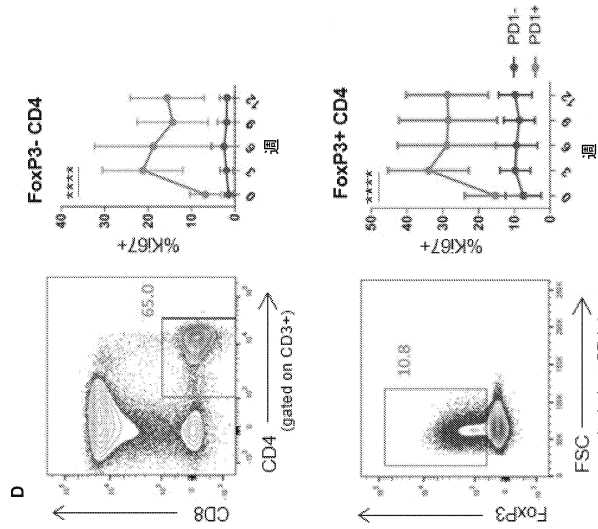
20

30

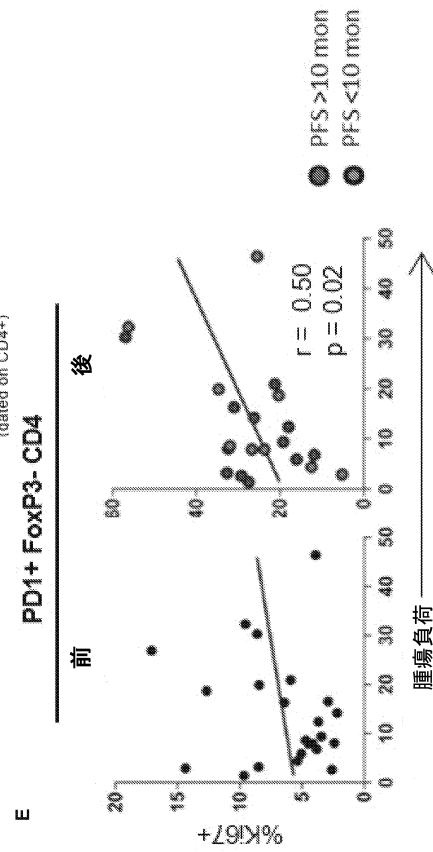
40

50

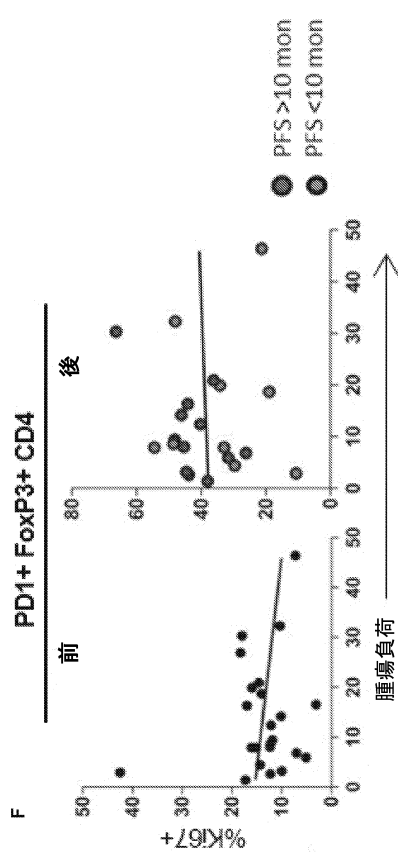
【図 2 5 - 2】



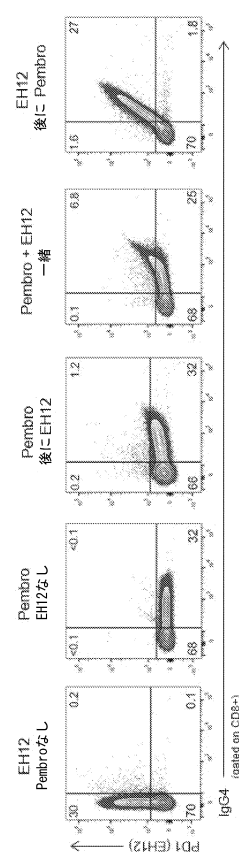
【図 2 5 - 3】



【図 2 5 - 4】



【図 2 6 A】



10

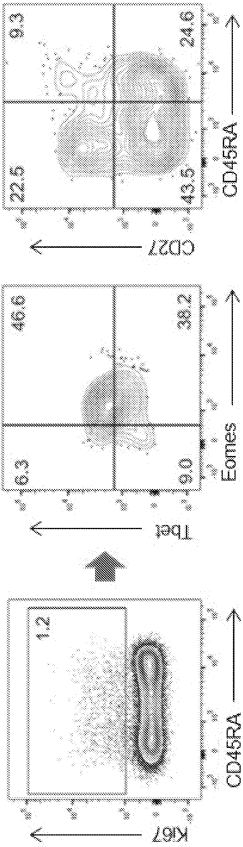
20

30

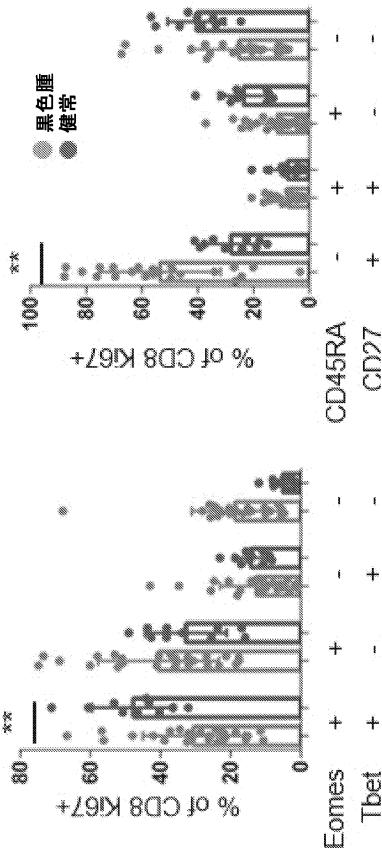
40

50

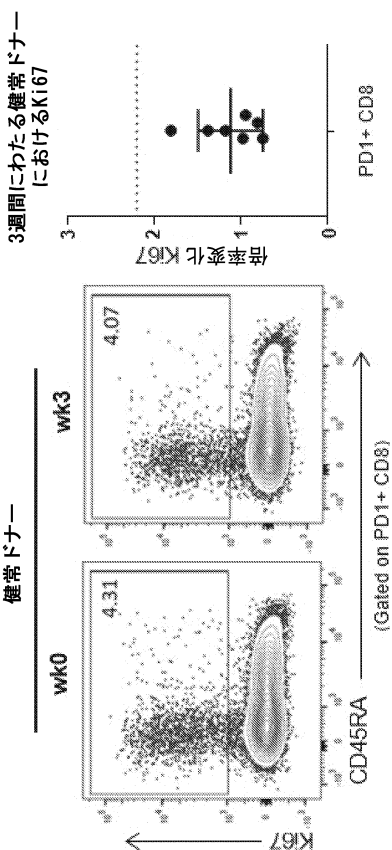
【図 2 6 B】



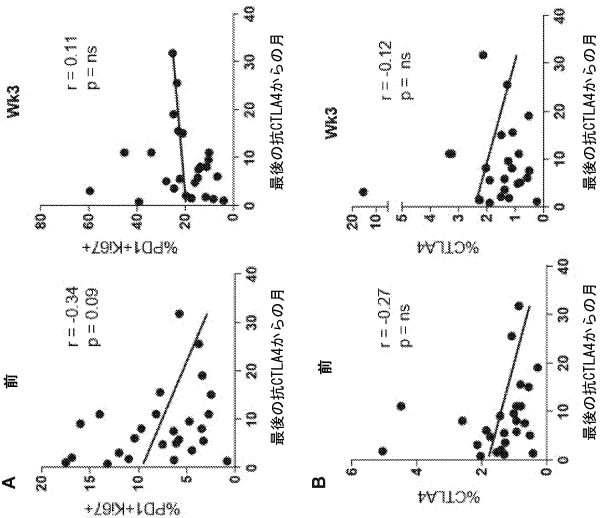
【図 2 6 C】



【図 2 6 D】



【図 2 7 - 1】



10

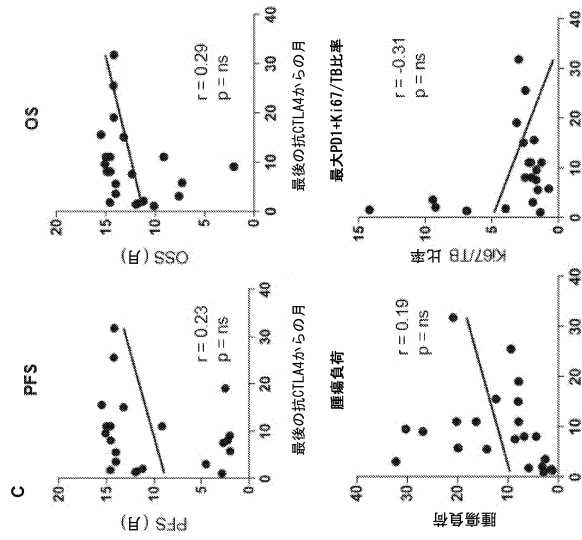
20

30

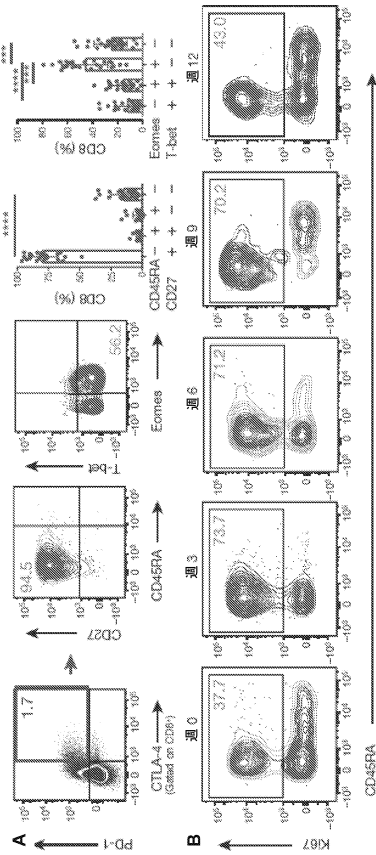
40

50

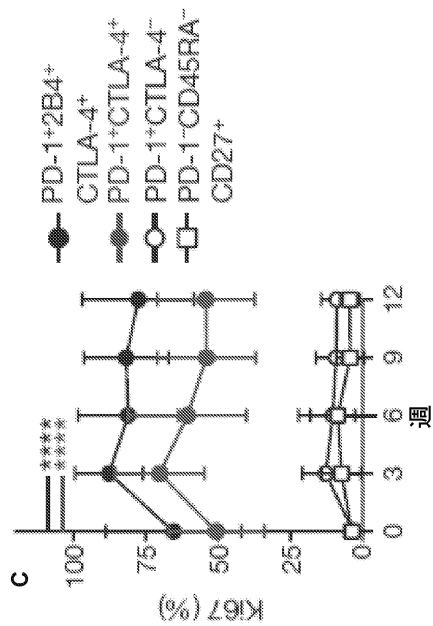
【図 27 - 2】



【図 28 - 1】



【図 28 - 2】



【図 28 - 3】



10

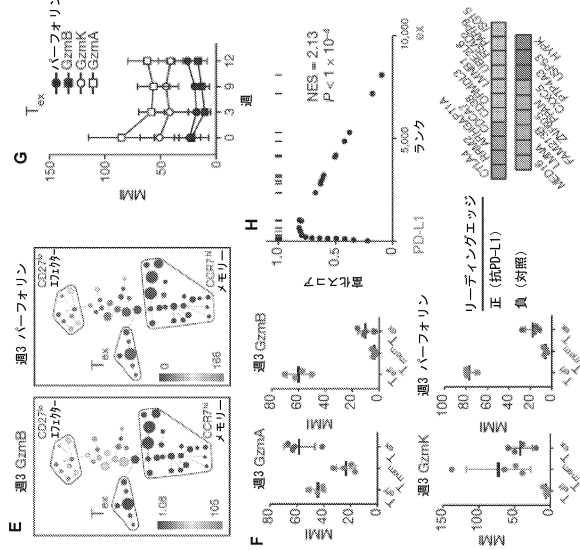
20

30

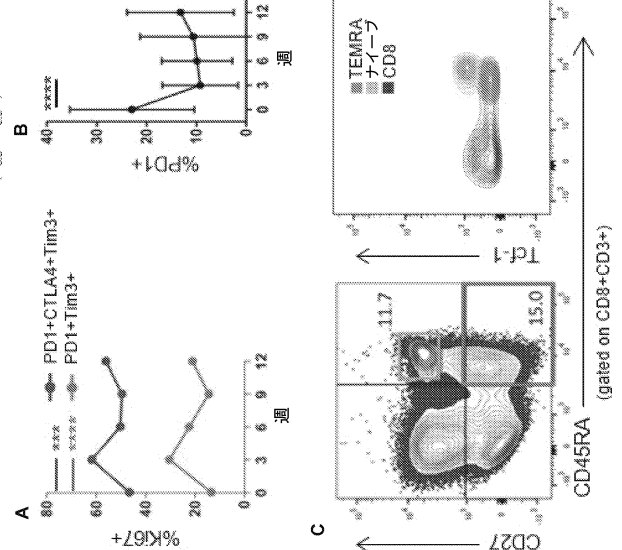
40

50

【図 28 - 4】

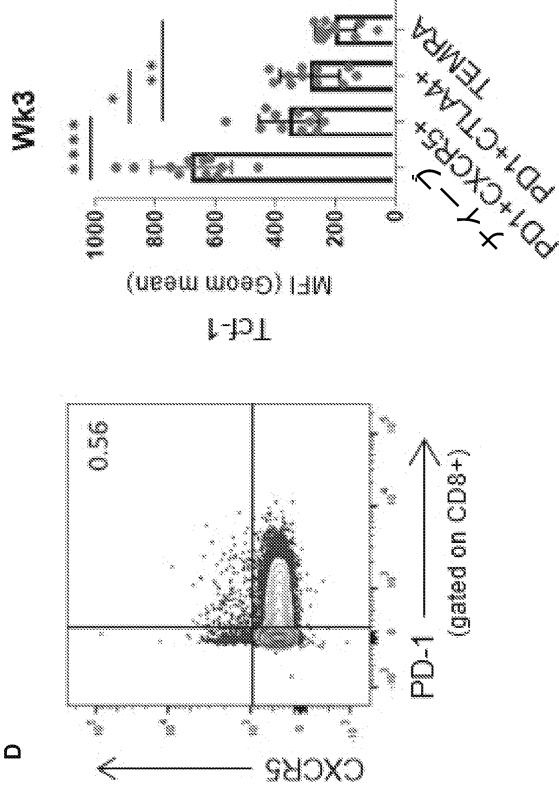


【図 29 - 1】

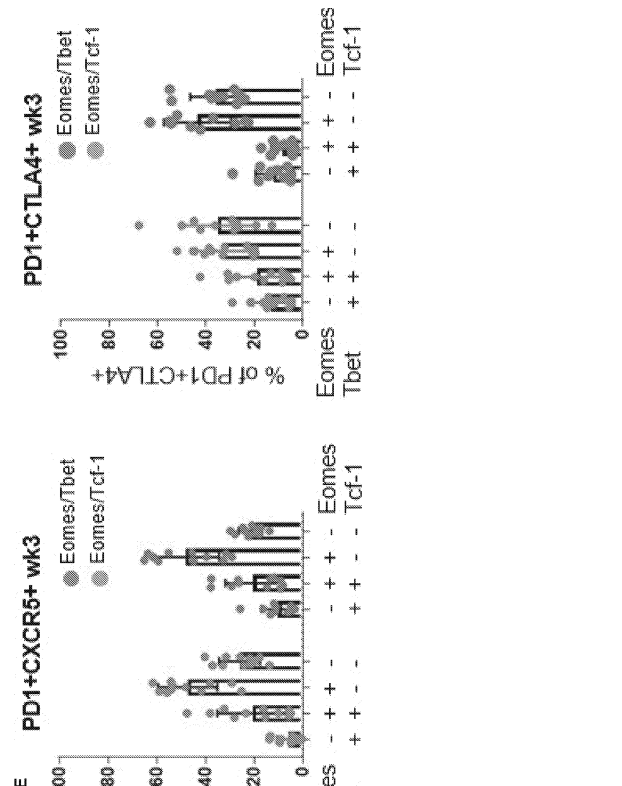


10

【図 29 - 2】



【図 29 - 3】



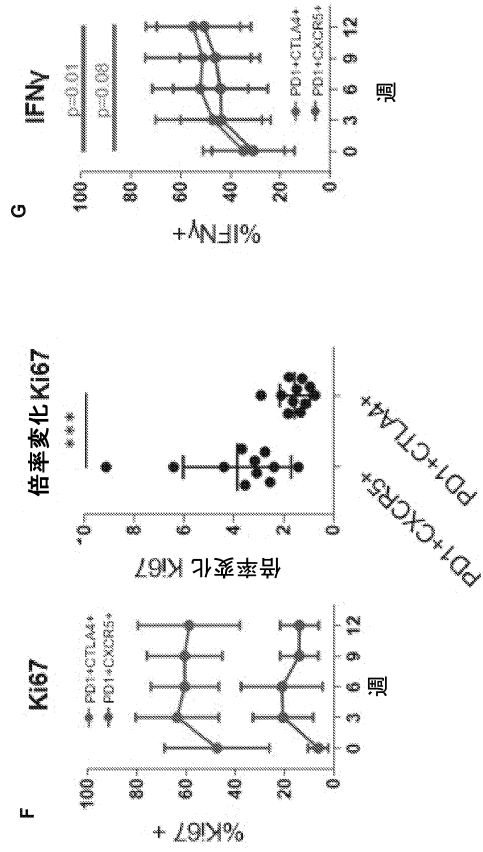
20

30

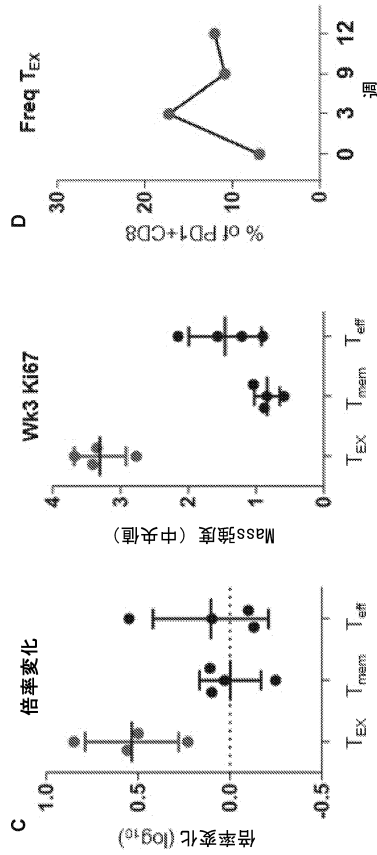
40

50

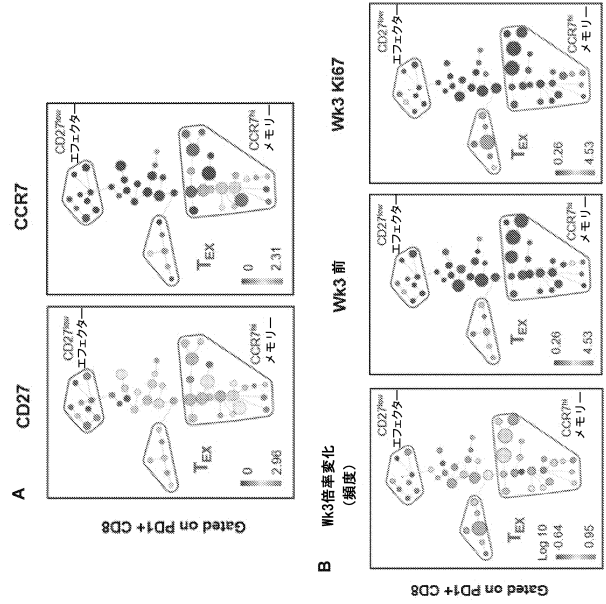
【図 29 - 4】



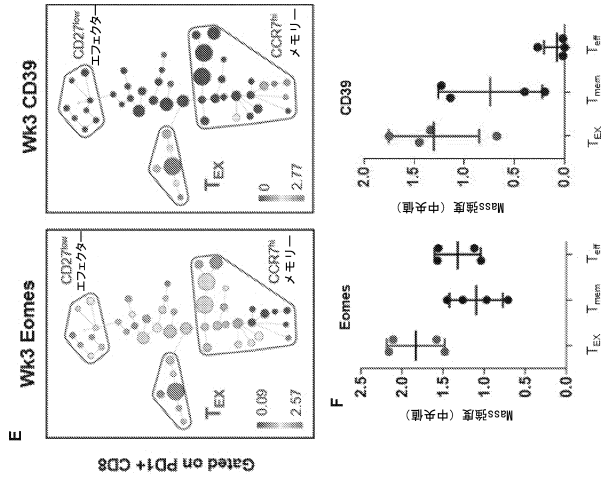
【図 30 - 2】



【図 30 - 1】



【図 30 - 3】



10

20

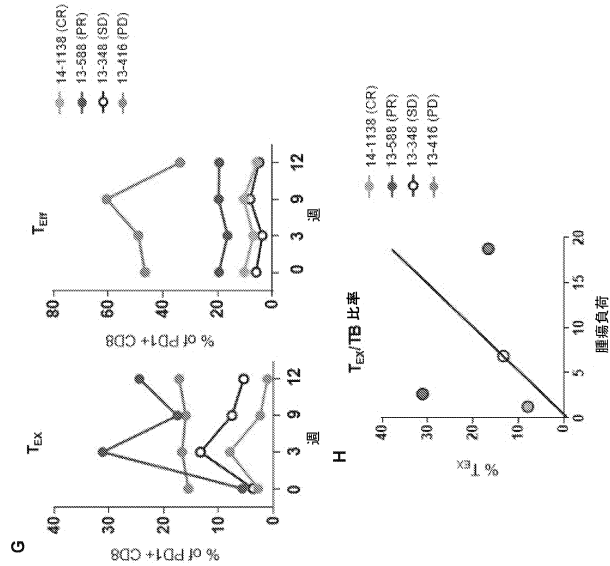
30

40

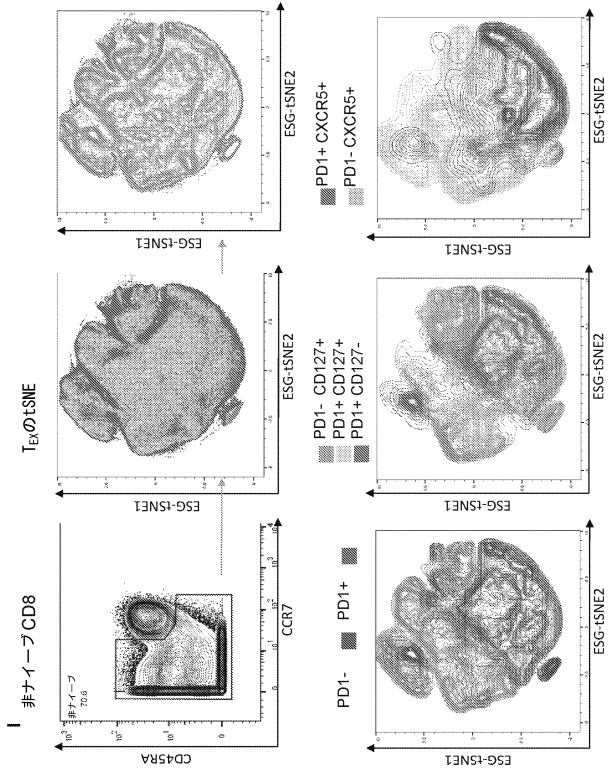
50



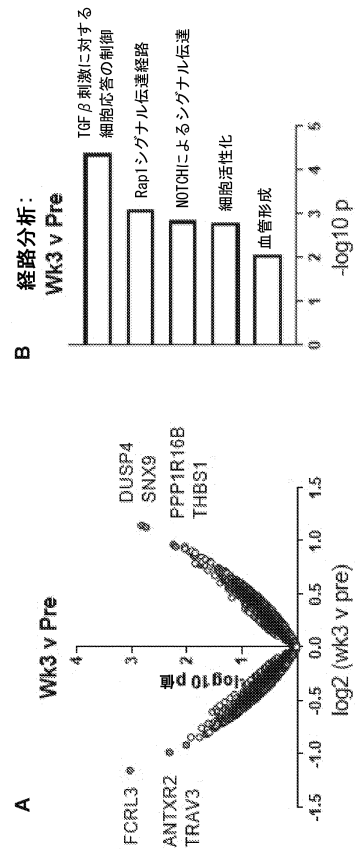
【図 3 0 - 4】



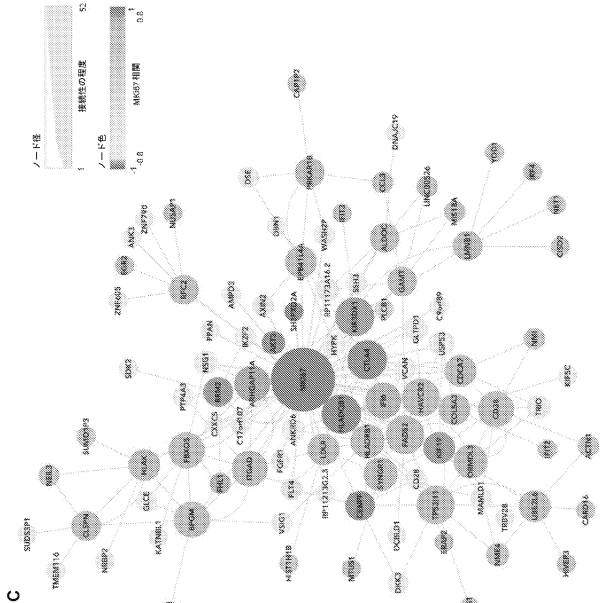
【図 3 0 - 5】



【図 3 1 - 1】



【図 3 1 - 2】



10

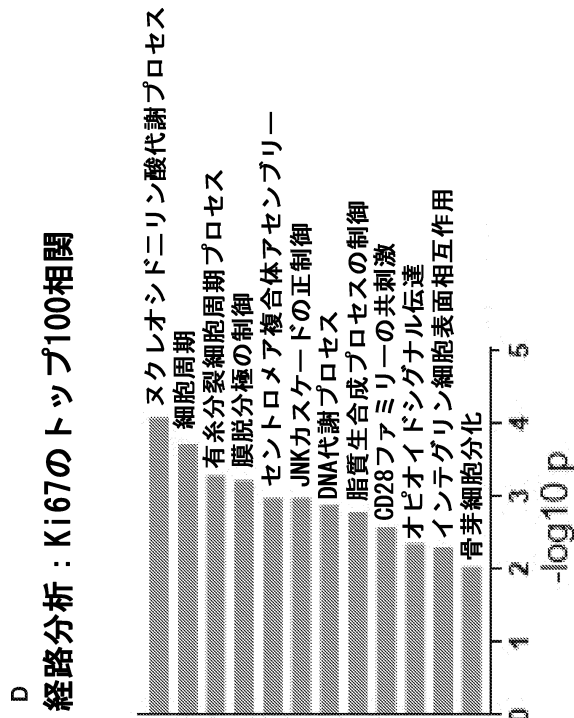
20

30

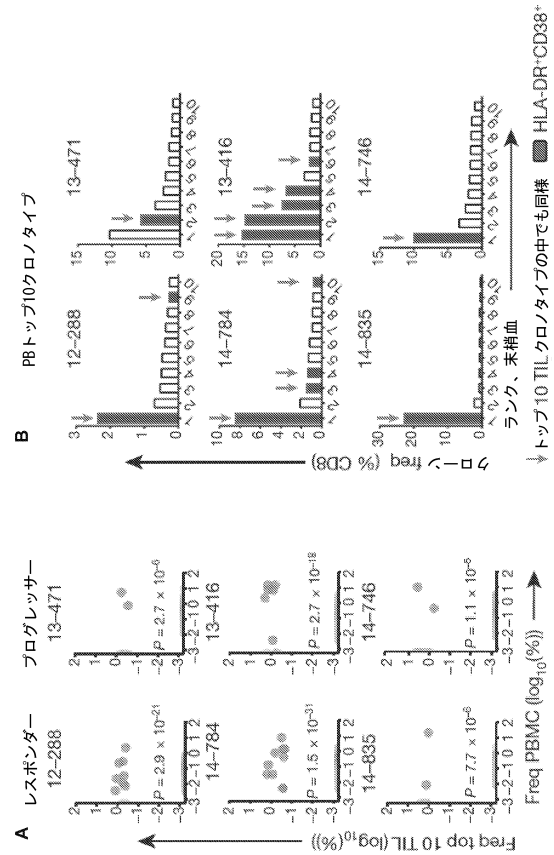
40

50

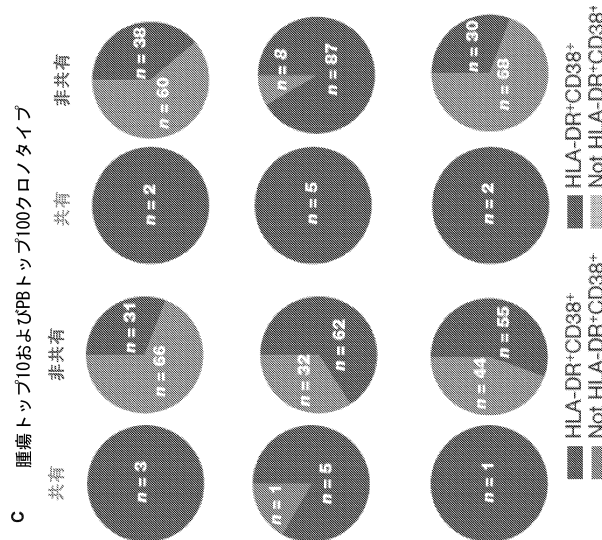
【図 3 1 - 3】



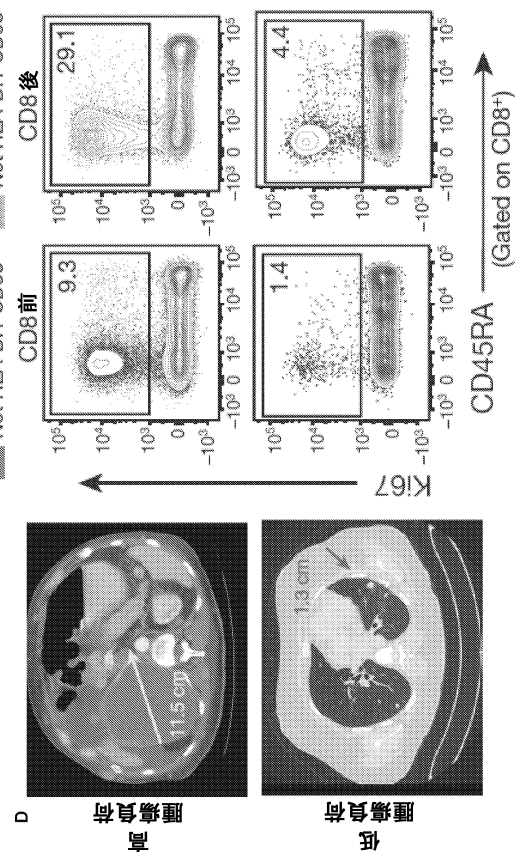
【図 3 2 - 1】



【図 3 2 - 2】



【図 3 2 - 3】



10

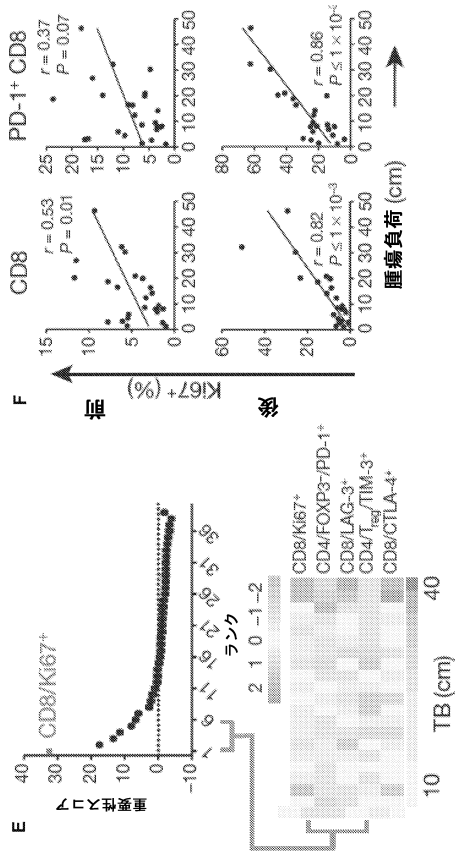
20

30

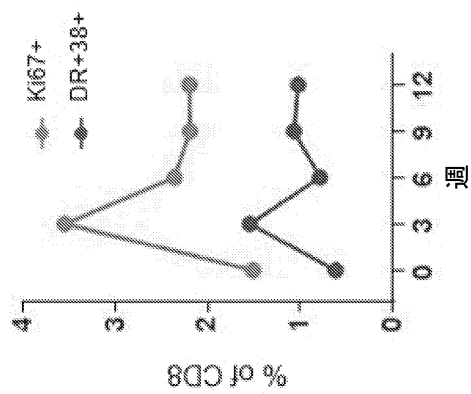
40

50

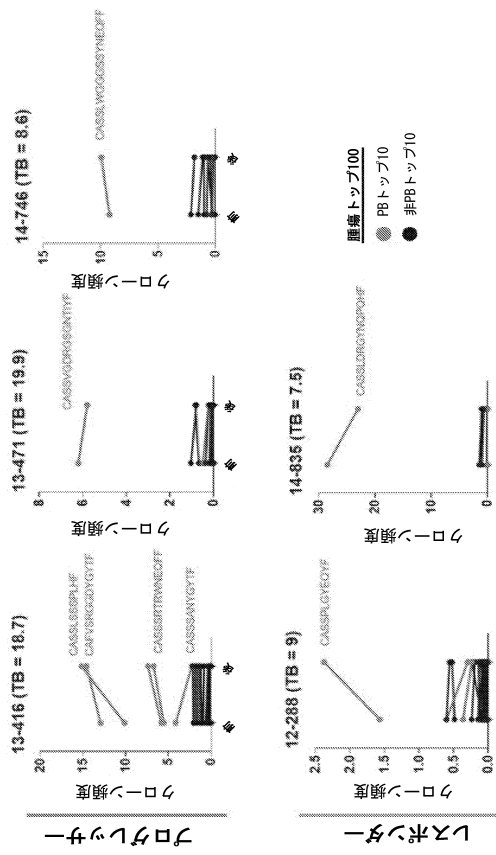
【図 3 2 - 4】



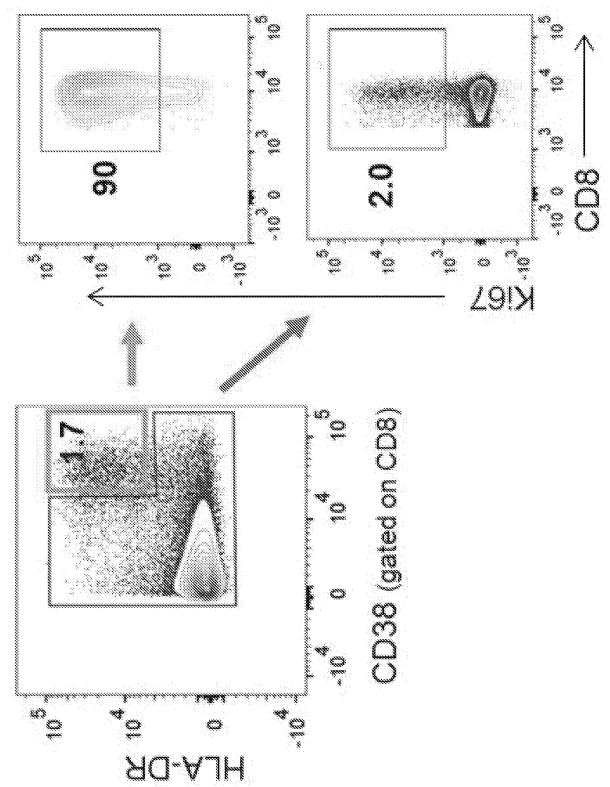
【図 3 3 B】



【図 3 3 A】



【図 3 3 C】



10

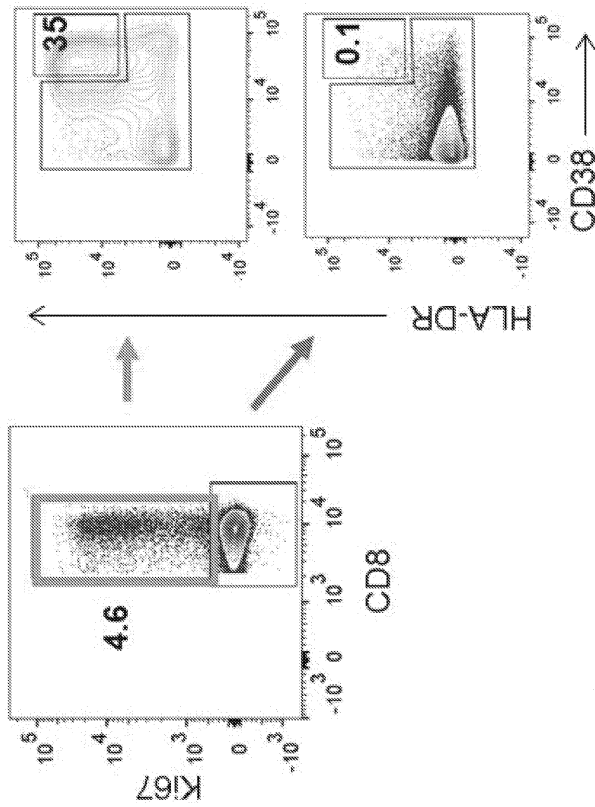
20

30

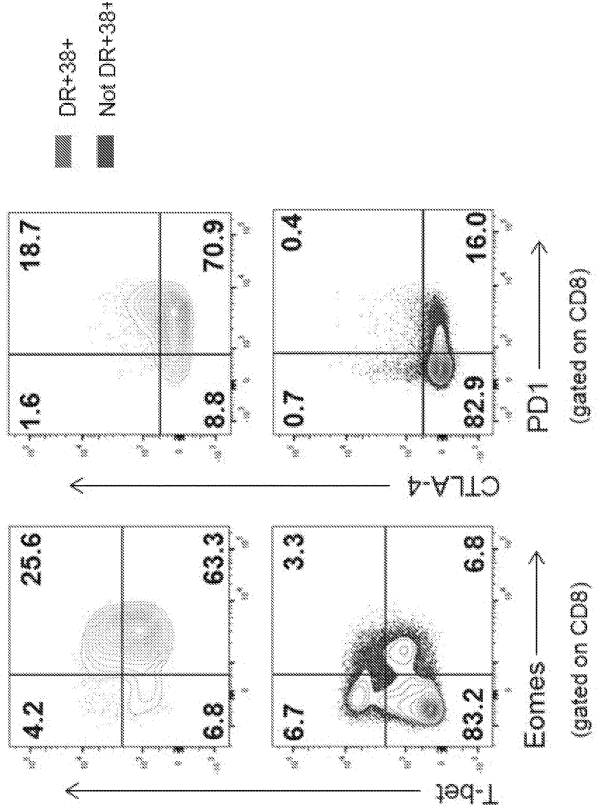
40

50

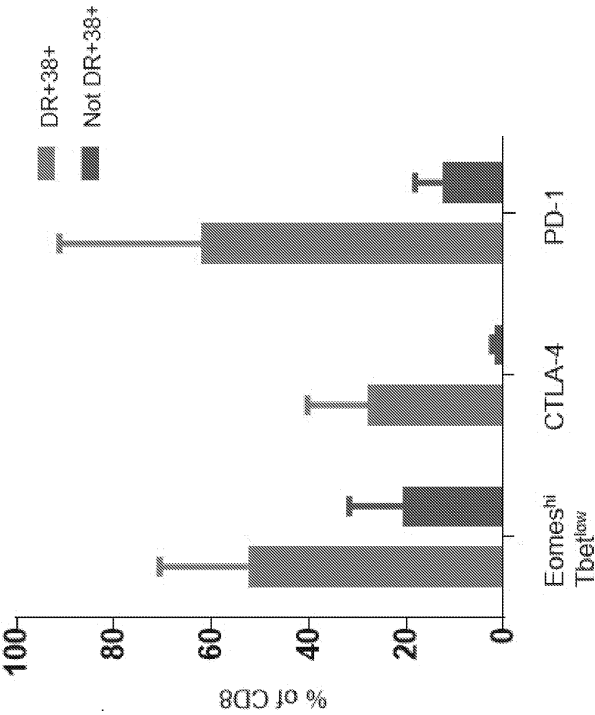
【図 3 3 D】



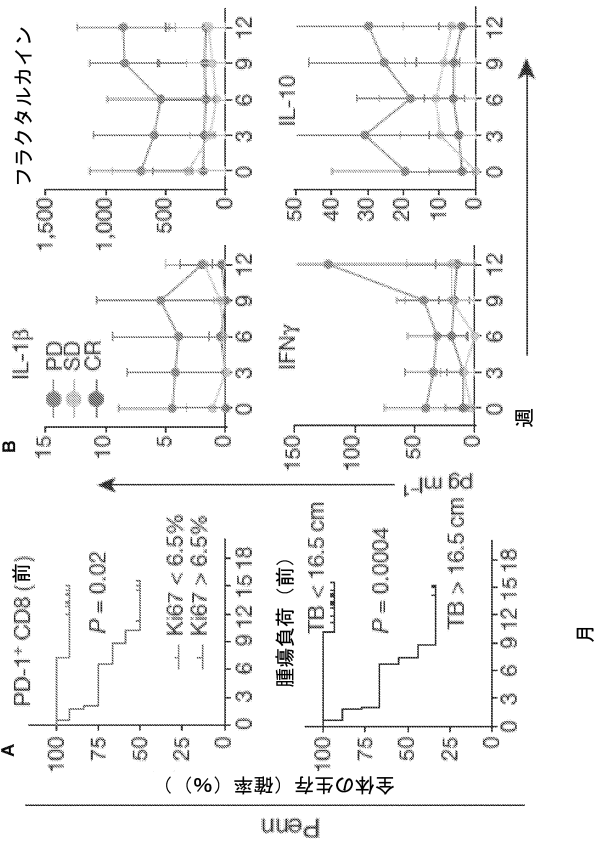
【図 3 3 E】



【図 3 3 F】



【図 3 4 - 1】



10

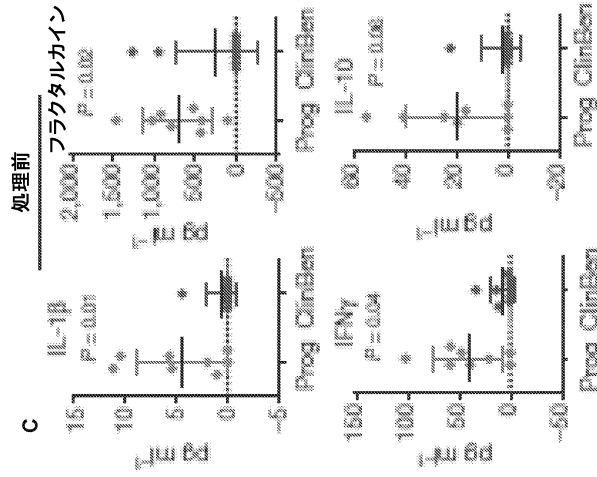
20

30

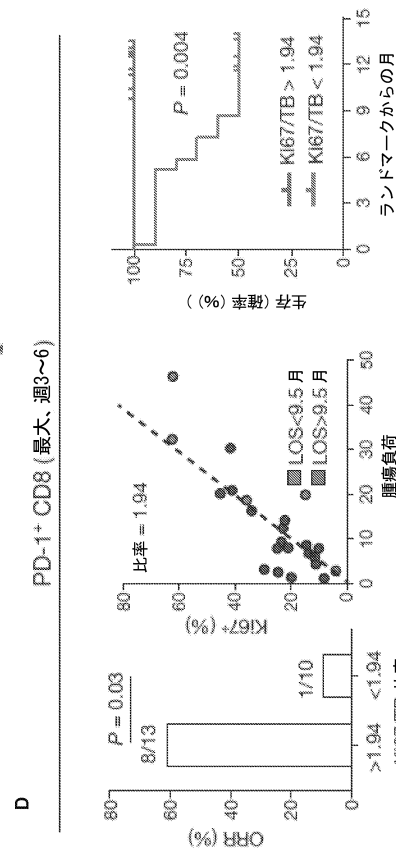
40

50

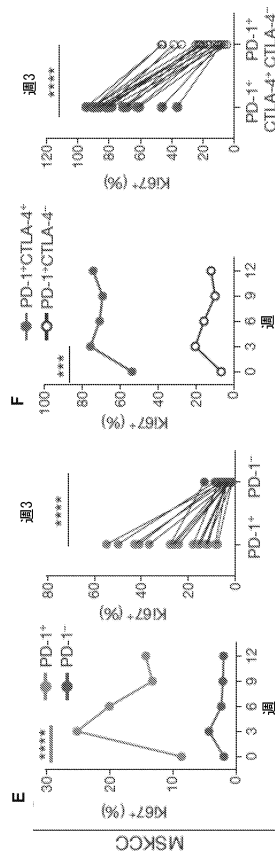
【図 3 4 - 2】



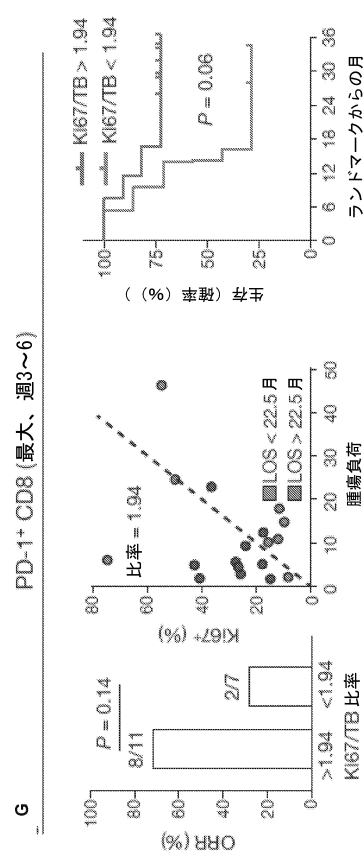
【図 3 4 - 3】



【図 3 4 - 4】



【図 3 4 - 5】



10

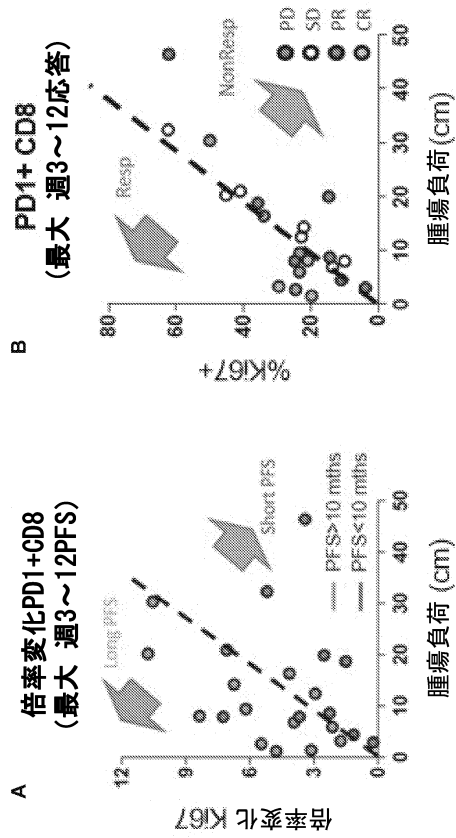
20

30

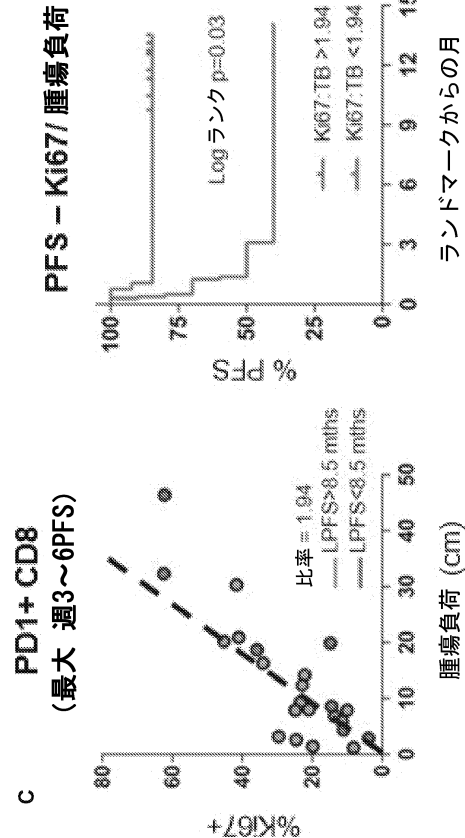
40

50

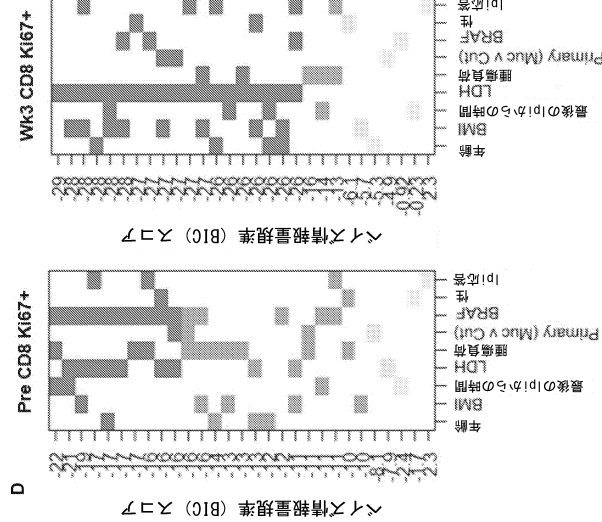
【図 3 5 - 1】



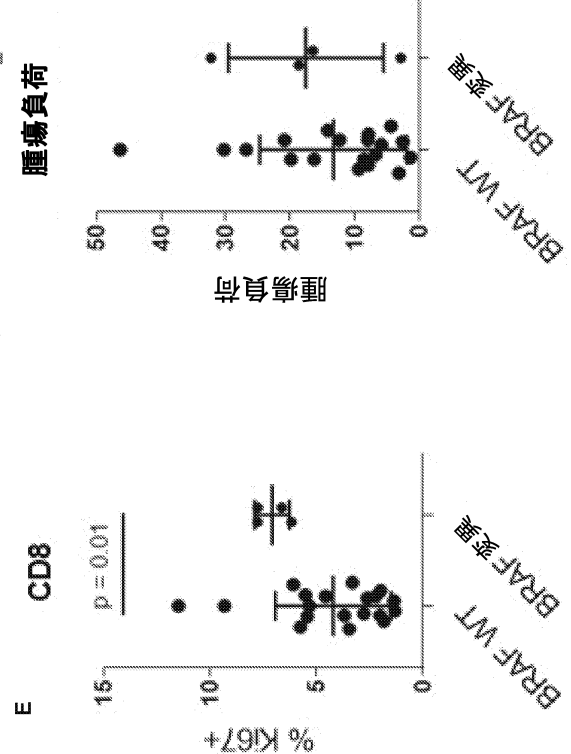
【図 3 5 - 2】



【図 3 5 - 3】



【図 3 5 - 4】



10

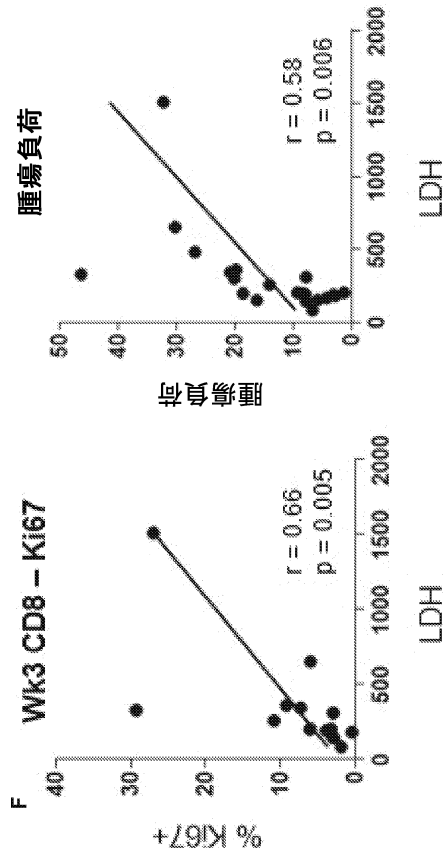
20

30

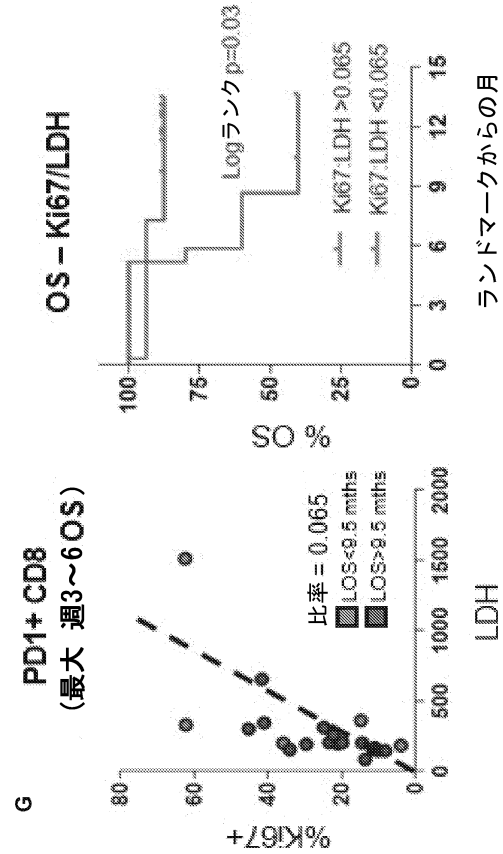
40

50

【図 3 5 - 5】

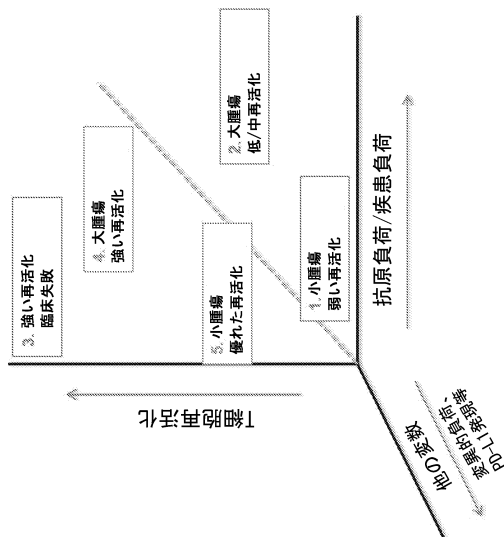


【図 3 5 - 6】

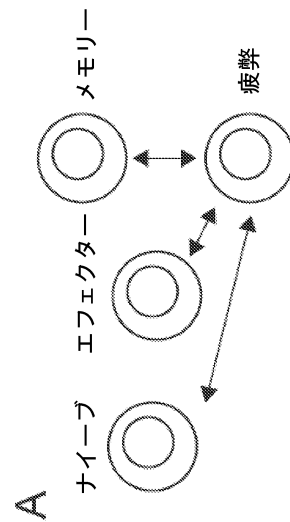


【図 3 6】

- 有望なメカニズム
1. 乏しいブライミング  
乏しい免疫原性
  2. 優れた免疫抑制  
激しい疲弊  
乏しい再活化  
第2のチェックポイント
  3. 腫瘍回避  
オフターゲット効果
  4. 強い再活化  
高いPD-L1、IFNシグニチャ
  5. より激しくない疲弊  
新しいT細胞ブライミング



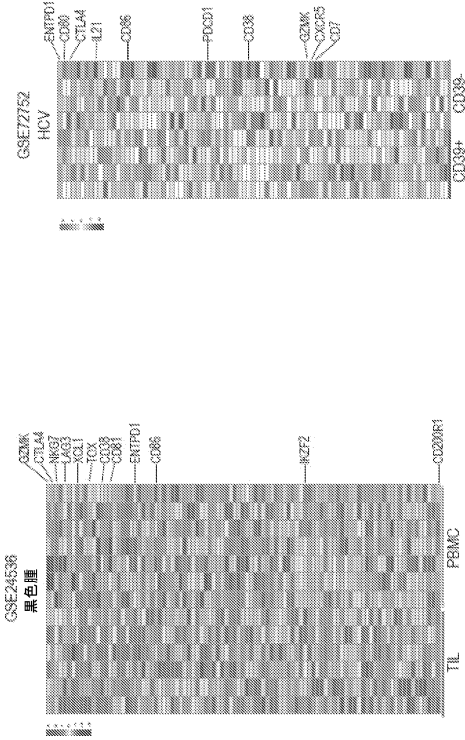
【図 3 7 - 1】



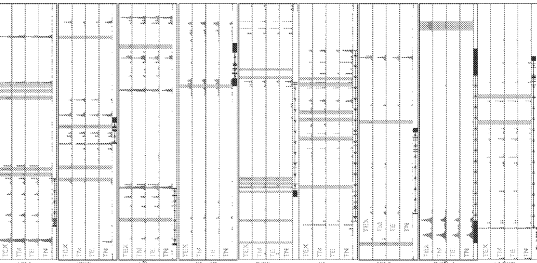




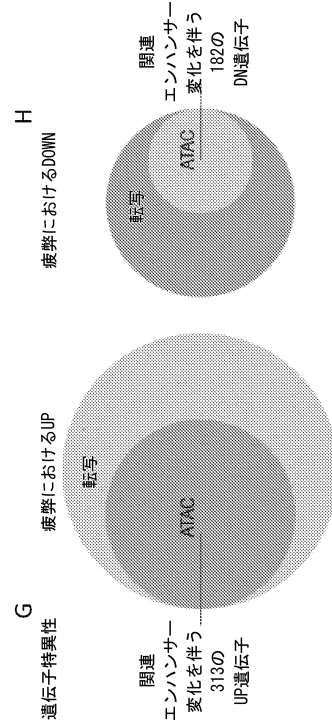
【図 37 - 6】



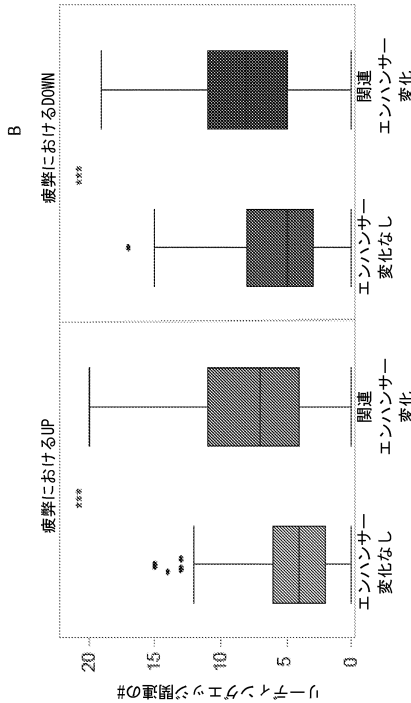
【図 38 - 2】



【図 38 - 1】



【図 38 - 3】



A

C

10

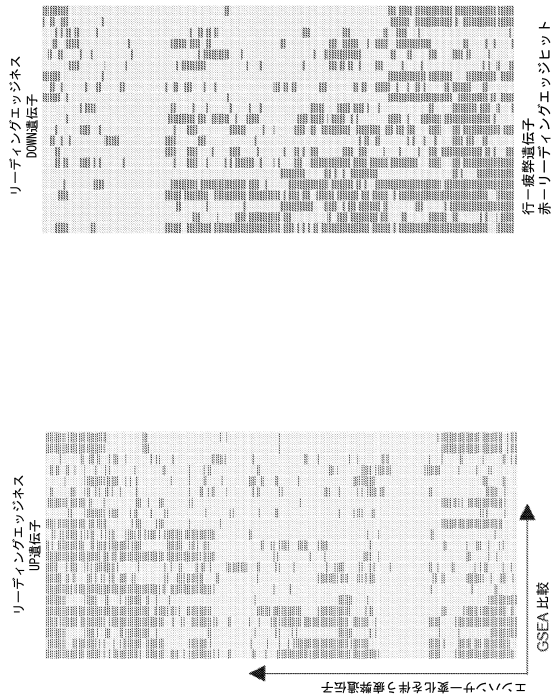
20

30

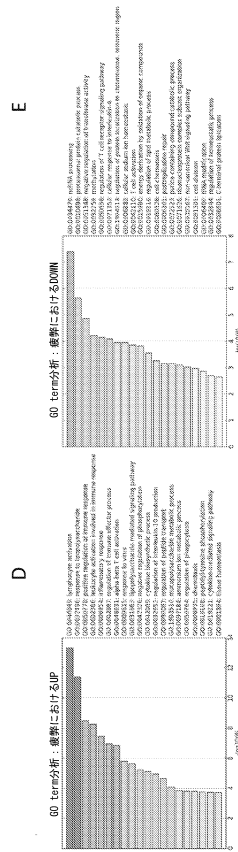
40

50

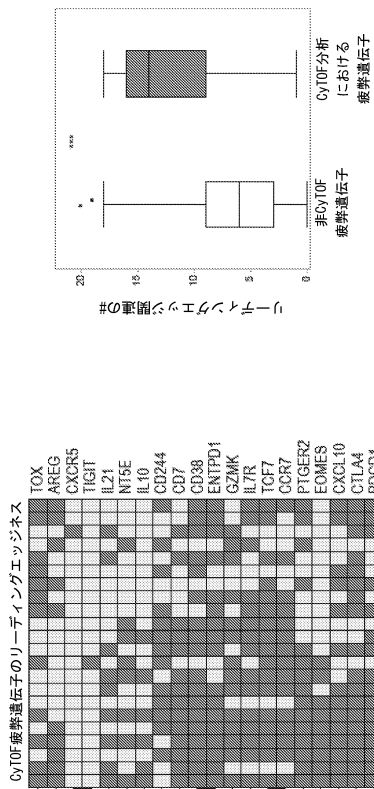
【図 38 - 4】



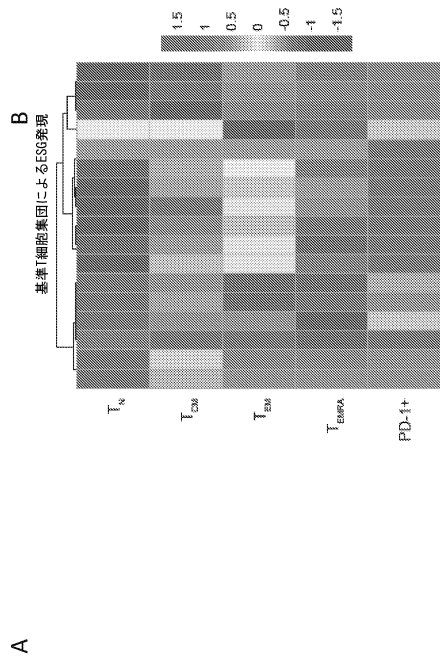
【図 38 - 5】



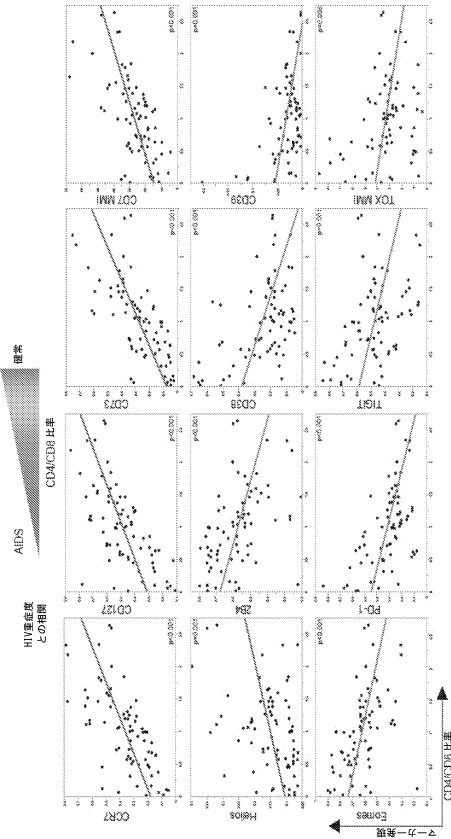
【図 39 - 1】



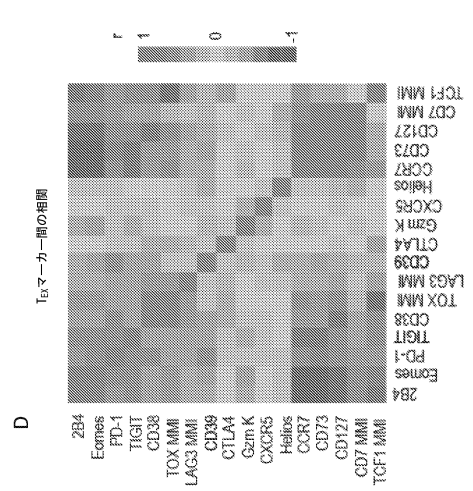
【図 39 - 2】



【図 39 - 3】



【図 39 - 4】

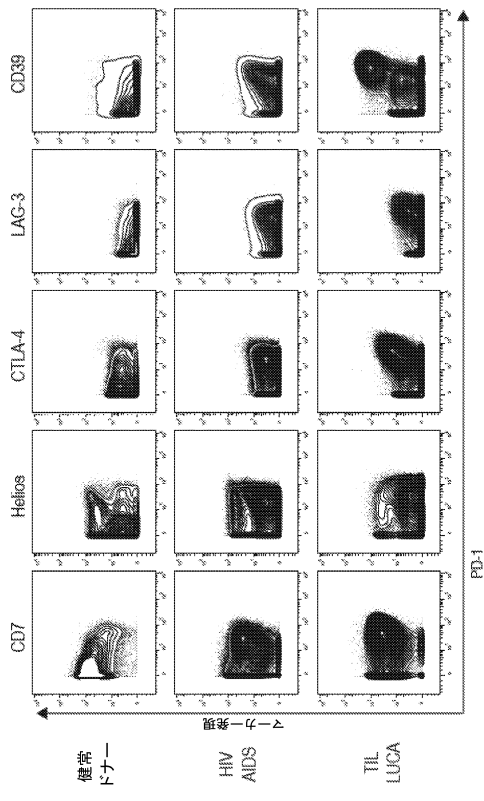


E

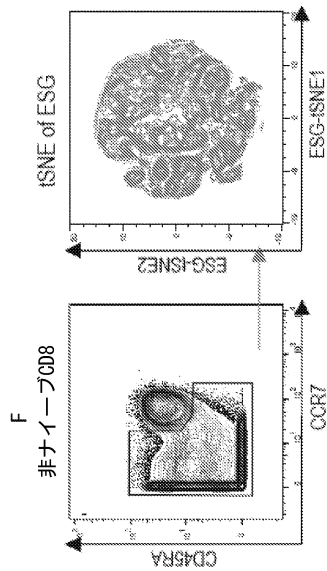
10

20

【図 39 - 5】



【図 40 - 1】



A

30

40

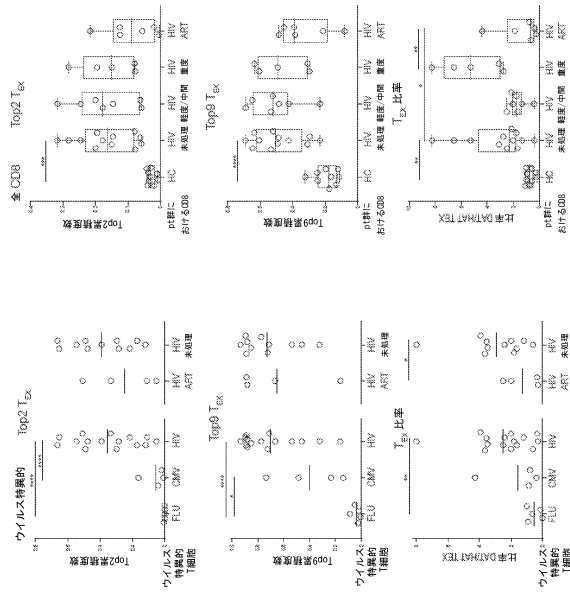
50



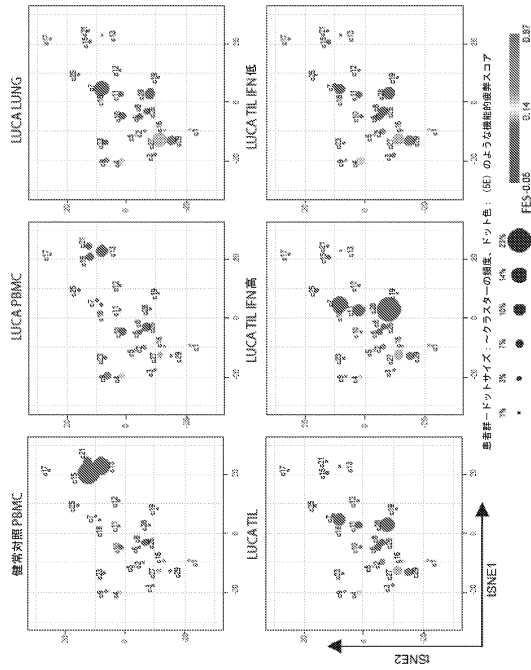




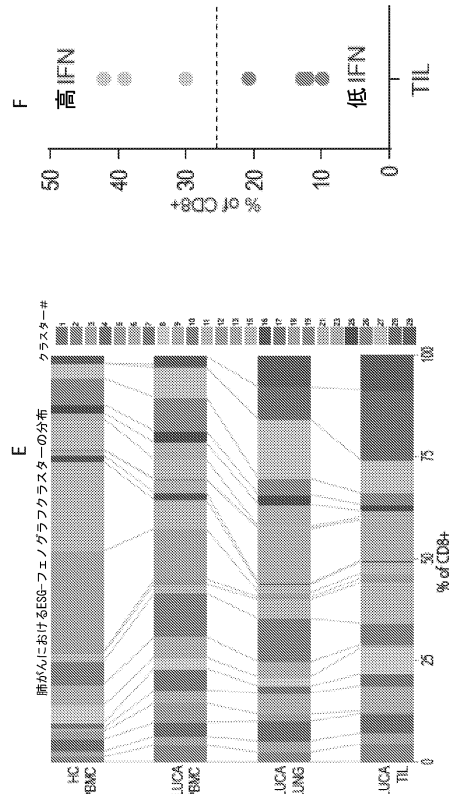
【図 4 2 - 4】



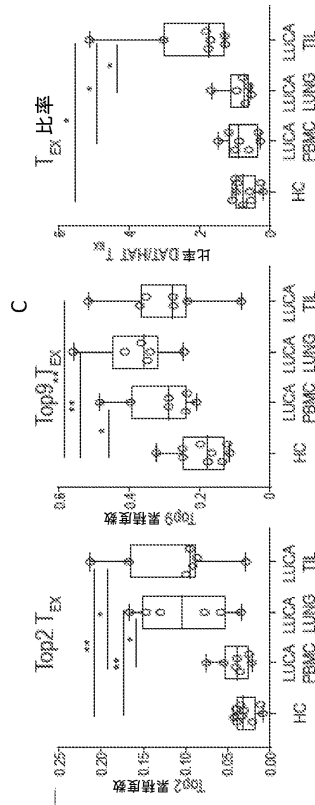
【図 4 3 - 2】



【図 4 3 - 1】



【図 4 3 - 3】



B

A

D

10

20

30

40

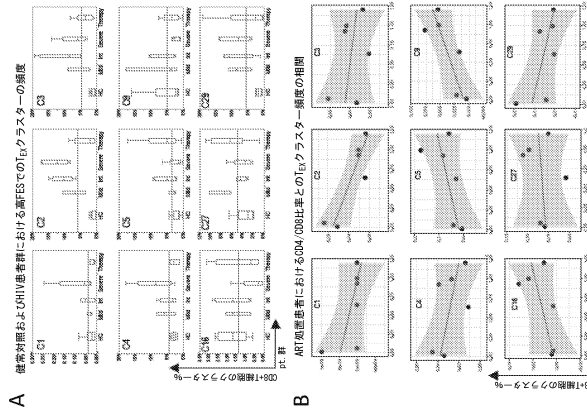
50





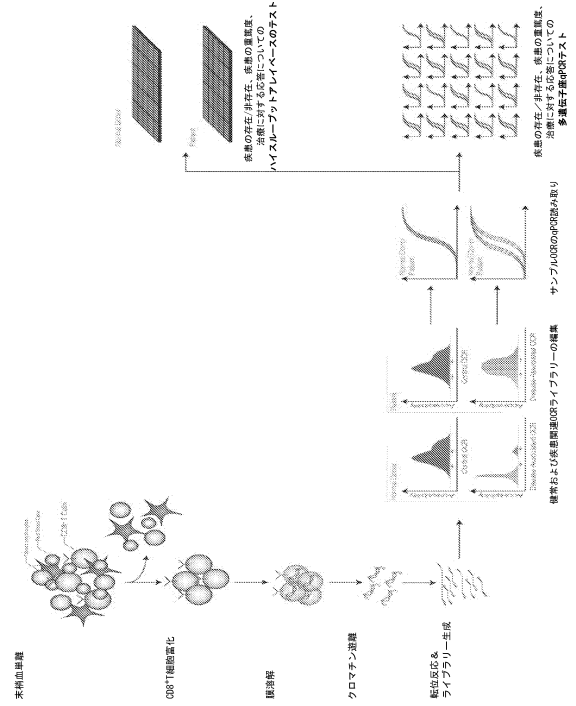


【図 4 9】



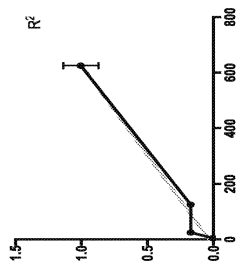
【図 5 0】

アッセイの総括および概要

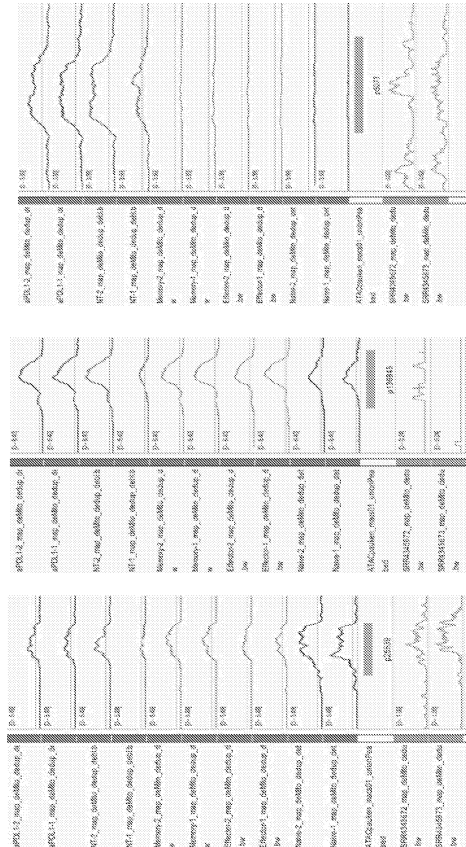


【図 5 1】

アッセイパフォーマンス：PCR読み出しスケール直線



【図 5 2 A】



10

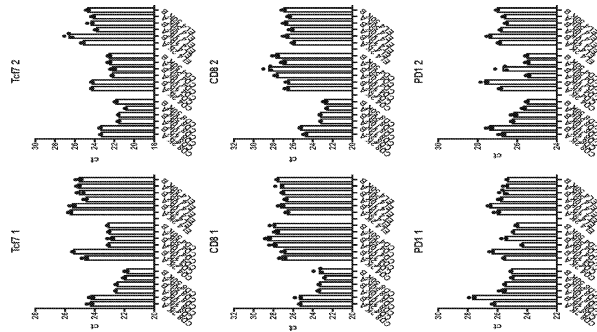
20

30

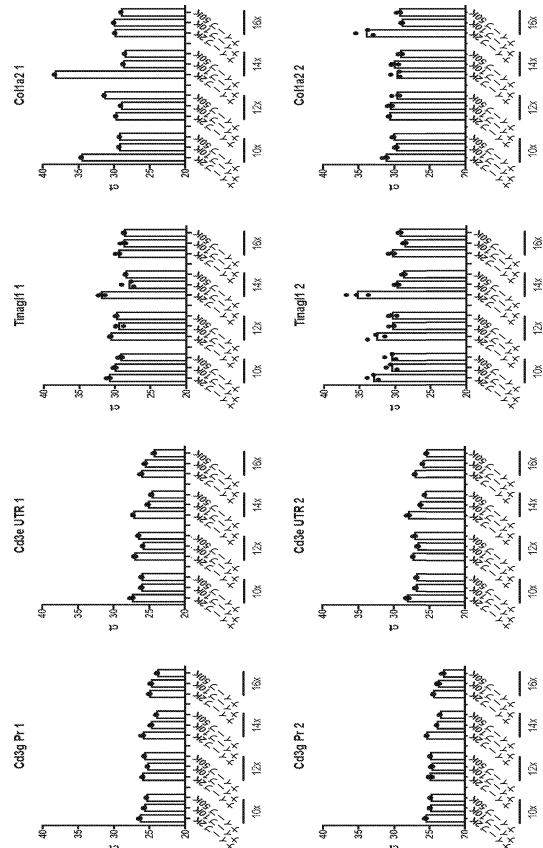
40

50

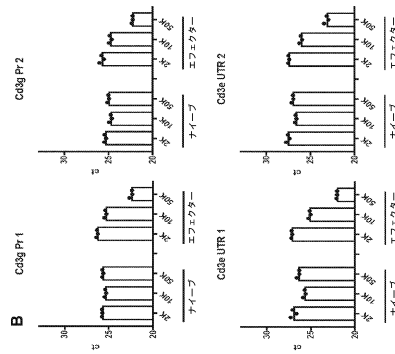
【図 5 2 B】



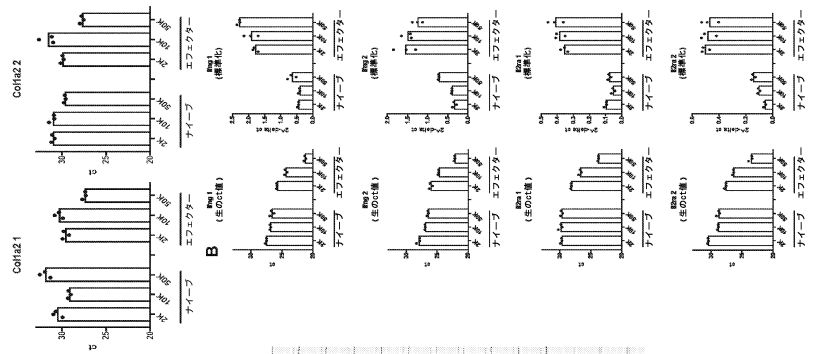
【図 5 3】



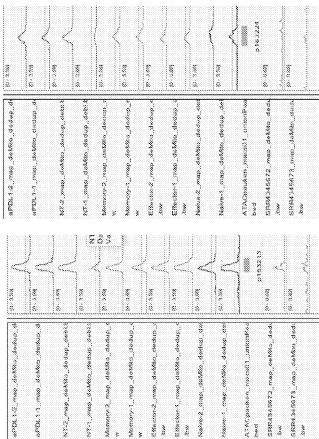
【図 5 4】



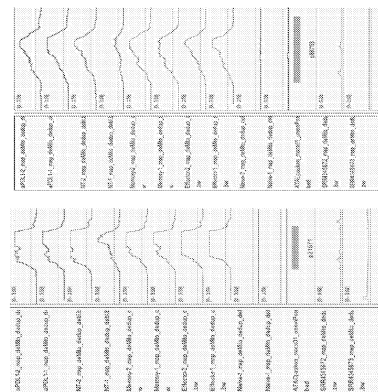
【図 5 5】



A



A



10

20

30

40

50

【配列表】

0007430136000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

- (51)国際特許分類 F I  
C 1 2 Q 1/6876(2018.01) C 1 2 Q 1/6876 Z
- (33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/660,754
- (32)優先日 平成30年4月20日(2018.4.20)
- (33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/661,467
- (32)優先日 平成30年4月23日(2018.4.23)
- (33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ウェリィ イー . ジョン  
アメリカ合衆国 1 9 0 8 3 ペンシルベニア州 ヘイバータウン ハースト アベニュー 8 0 9
- (72)発明者 ベングシュ バートラム  
アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア モントローズ ストリート 2  
3 5 7
- (72)発明者 カーン オマール  
アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア フィッツウォーター ストリート 2 2 4 1 アpartment 3
- (72)発明者 ウー ジェニファー  
アメリカ合衆国 1 9 1 4 6 ペンシルベニア州 フィラデルフィア サウス トウェンティファースト ストリート 9 1 8 ユニット 2
- (72)発明者 ジャイルズ ジョゼフィン  
アメリカ合衆国 1 9 1 4 7 ペンシルベニア州 フィラデルフィア ベインブリッジ ストリート 9 1 5 # 1 0 3
- 審査官 北条 弥作子
- (56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 0 0 7 3 0 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 5 4 1 2 ( W O , A 2 )  
国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 5 4 5 1 ( W O , A 1 )  
WHERRY, E. J. et al. , Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection , Immunity , 2007年10月18日 , Vol.27, No.4 , pp.670-684  
BAITSCH, L. et al. , Exhaustion of tumor-specific CD8+T cells in metastases from melanoma patients , The Journal of Clinical Investigation , 2011年05月09日 , Vol.121, No.6 , pp.2350-2360
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 ~ 3 3 / 9 8