

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-514631

(P2021-514631A)

(43) 公表日 令和3年6月17日(2021.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B O 2 9
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C O 7 K 14/725 (2006.01)	C O 7 K 14/725	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 159 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-544661 (P2020-544661)	(71) 出願人	506139369
(86) (22) 出願日	平成31年2月21日 (2019. 2. 21)		フレッド ハッチンソン キャンサー リ
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月13日 (2020. 10. 13)		サーチ センター
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/019014		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
(87) 国際公開番号	W02019/165116		フェアビュー アベニュー ノース 1
(87) 国際公開日	令和1年8月29日 (2019. 8. 29)		1 0 0
(31) 優先権主張番号	62/635, 450	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成30年2月26日 (2018. 2. 26)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/676, 787	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成30年5月25日 (2018. 5. 25)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞免疫療法のための組成物および方法

(57) 【要約】

本開示は、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質、およびがんを処置するための免疫療法におけるその使用を提供する。一部の実施形態では、融合タンパク質を発現し、がんおよび他の疾患を処置するための細胞免疫療法において用途を有する宿主免疫細胞が提供される。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、本開示によるキメラ抗原受容体(CAR)を含む。本開示は、一般的に、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質(例えば、キメラ抗原受容体、キメラ共刺激受容体)に関する。

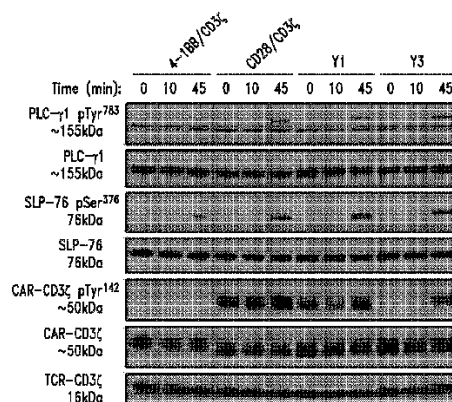


FIG. 7G

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 標的抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外成分；

(b) 改変された機能的な C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内成分であって、前記改変された機能的な C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、細胞内成分；および

(c) 前記細胞外成分と前記細胞内成分との間に配置された疎水性部分を含む融合タンパク質であって、

前記融合タンパク質は、野生型 C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質とは異なる 1 つまたは複数の機能的な活性を有する、融合タンパク質。

10

【請求項 2】

前記 C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメイン中の少なくとも 1 つのチロシン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つのチロシン残基が、191、206、209 および 218 位のいずれか 1 つから選択される、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

191、206、209、および 218 位のいずれかから選択される少なくとも 2 つのチロシン残基がそれぞれ、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 5】

191、206、209、および 218 位のいずれかから選択される少なくとも 3 つのチロシン残基がそれぞれ、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

191、206、209、および 218 位における 4 つのチロシン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

各チロシン残基が、独立して、トリプトファン残基またはフェニルアラニン残基で置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 8】

各チロシン残基が、フェニルアラニン残基で置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

各チロシン残基が、トリプトファン残基で置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記改変された C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインが、Y 218 F 置換を含む、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記改変された C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインが、Y 206 F、Y 209 F、および Y 218 F 置換を含む、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 12】

前記改変された C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインが、Y 191 F、Y 206 F、Y 209 F、および Y 218 F 置換を含む、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

前記 C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメイン中の少なくとも 1 つのプロリン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つのプロリン残基が、196、199、208、および 211 位のいずれか 1 つから選択される、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

196、199、208、および 211 位のいずれかから選択される少なくとも 2 つのプロリン残基がそれぞれ、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

196、199、208、および 211 位のいずれかから選択される少なくとも 3 つのプロリン残基がそれぞれ、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 17】

196、199、208、および 211 位における 4 つのプロリン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されている、請求項 13 に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

各プロリン残基が、アラニン残基で置換されている、請求項 13 から 17 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

前記改変された CD28 共刺激シグナル伝達ドメインが、L186 および L187 置換をさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 20】

前記 L186 置換が、L186G であり、前記 L187 置換が、L187G である、請求項 19 に記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

前記改変された CD28 共刺激シグナル伝達ドメインが、Y191、P208、P211、またはそれらのあらゆる組合せにおける置換を含まない、請求項 1 から 11、13 から 15、および 18 から 20 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

前記結合ドメインが、scFv、scTCR、受容体の細胞外ドメイン、またはリガンドである、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 23】

前記結合ドメインが、CD8 の細胞外結合ドメインまたは部分も、機能的な IgV 様ドメインを含むそれらのいずれの部分も含まない、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

前記結合ドメインが、CD8α 鎖由来の結合ドメインも、CD8β 鎖由来の結合ドメインも、CD8α ホモ二量体由来の結合ドメインも、CD8αβ ヘテロ二量体由来の結合ドメインも含まない、請求項 23 に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

前記結合ドメインが、キメラ、ヒト、またはヒト化されたものである、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 26】

前記細胞外成分が、前記結合ドメインと前記疎水性部分との間に配置されたスペーサーをさらに含む、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

前記スペーサーが、免疫グロブリンのヒンジ領域、CH2 ドメイン、CH3 ドメイン、またはそれらのあらゆる組合せを含む、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 28】

前記免疫グロブリンのヒンジ領域が、IgG4 のヒンジ領域である、請求項 27 に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 29】

前記細胞外成分が、前記結合ドメインと前記疎水性部分との間に配置されたタグをさらに含む、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 30】

前記タグが、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（配列番号 40）のアミノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

前記細胞内成分が、ITAM 含有 T 細胞活性化ドメインをさらに含む、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 32】

前記 ITAM 含有 T 細胞活性化ドメインが、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、Fc ϵ RI のガンマ鎖、または Fc γ RI のガンマ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項 31 に記載の融合タンパク質。

【請求項 33】

前記細胞内成分が、CD3 ζ 細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項 32 に記載の融合タンパク質。

【請求項 34】

前記細胞内成分が、少なくとも 1 つの追加の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 35】

前記少なくとも 1 つの追加の共刺激シグナル伝達ドメインが、CD27、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX-40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG3）、CD270（HVEM）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、CD278（ICOS）、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70、CD5、BAFF-R、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3、CD83 と特異的に結合するリガンド、またはそれらの組合せから選択される、請求項 34 に記載の融合タンパク質

【請求項 36】

前記疎水性部分が、膜貫通ドメインである、請求項 1 から 35 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 37】

前記膜貫通ドメインが、CD28、CD2、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD40、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95（Fas）、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA4）、CD200R、CD223（LAG3）、CD270（HVEM）、CD272（BTLA）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、CD278（ICOS）、CD279（PD-1）、CD300、CD357（GITR）、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、Slp76、SIRP α 、pT α 、TCR α 、TCR β 、TIM3、TRIM、LPA5、または Zap70 の膜貫通ドメインを含む、請求項 36 に記載の融合タンパク質。

【請求項 38】

前記標的抗原が、がん抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、または自己抗原である、請求項 1 から 37 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 39】

前記標的抗原が、BCMA、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、

10

20

30

40

50

オーアセチルGD2、オーアセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFB β 2、TGFB β 1、IL6R、gp130、ルイスA、ルイスY、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A、メソテリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合した腫瘍または病原体関連のペプチド、HLAに結合したhTERTペプチド、HLAに結合したチロシナーゼペプチド、HLAに結合したWT-1ペプチド、LT β R、LIFR β 、LRP5、MUC1、OSMR β 、TCR α 、TCR β 、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、HA¹-H、Robo1、 α -フェトプロテイン(AFP)、Friszled、OX40、PRAME、およびSSX-2から選択されるがん抗原である、請求項36に記載の融合タンパク質。

【請求項40】

請求項1から39のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項41】

核酸分子が、コドン最適化されている、請求項40に記載のポリヌクレオチド。

【請求項42】

配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、48、50、52、54、56、または58のいずれか1つに記載の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも約75%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項40または41に記載のポリヌクレオチド。

【請求項43】

形質導入マーカー、自殺遺伝子、またはその両方をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項40から42のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項44】

前記形質導入マーカーが、トランケート型EGFR分子である、請求項43に記載のポリヌクレオチド。

【請求項45】

配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、48、50、52、54、56、または58のいずれか1つに対して少なくとも約75%の同一性を有するポリヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、請求項40から44のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項46】

請求項40から45のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項47】

ウイルスベクターである、請求項46に記載のベクター。

【請求項48】

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスベクターである、請求項47に記載のベクター。

【請求項49】

請求項1から39のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項40から45のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項46から48のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項50】

免疫系細胞である、請求項49に記載の宿主細胞。

【請求項51】

前記免疫系細胞が、T細胞である、請求項50に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

前記 T 細胞が、C D 4 + T 細胞または C D 8 + T 細胞である、請求項 5 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 3】

前記 T 細胞が、メモリー T 細胞である、請求項 5 1 または 5 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 4】

ヒト細胞である、請求項 4 9 から 5 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 5】

内因性遺伝子の発現が、前記宿主細胞中で阻害され、阻害される前記内因性遺伝子は、T C R 遺伝子、H L A 遺伝子、免疫抑制成分の遺伝子、またはそれらのあらゆる組合せから選択される、請求項 4 9 から 5 4 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

10

【請求項 5 6】

前記 T C R 遺伝子が、T 細胞受容体 α 定常 (T R A C) 遺伝子、T 細胞受容体 β 定常 (T R B C) 遺伝子、またはその両方である、請求項 5 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 7】

請求項 4 0 から 4 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、または請求項 4 6 から 4 8 のいずれか一項に記載のベクターが、エンドヌクレアーゼ系を介して、前記 T C R 遺伝子または H L A 遺伝子の遺伝子座に標的化されている、請求項 5 5 または 5 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 8】

前記エンドヌクレアーゼ系が、C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 系、または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 系である、請求項 5 7 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 5 9】

前記融合タンパク質の持続的なリン酸化の減少、前記融合タンパク質のシグナル伝達の減少、サイトカイン発現の減少、存続の強化、抗原特異的な細胞溶解活性の強化、またはそれらのあらゆる組合せを呈示する、請求項 4 9 から 5 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 6 0】

野生型 C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質を含む宿主細胞と比較して減少したレベルの標的抗原によって誘導された I L - 2、T N F - α 、またはその両方を発現する、請求項 4 9 から 5 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

30

【請求項 6 1】

請求項 4 0 から 4 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、請求項 4 6 から 4 8 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 4 9 から 6 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞、および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 6 2】

被験体における疾患を処置する方法であって、請求項 4 9 から 6 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞または請求項 6 1 に記載の医薬組成物を前記被験体に投与することを含み、前記疾患は、融合タンパク質と結合した抗原の存在に関連する、方法。

40

【請求項 6 3】

前記疾患が、ウイルス感染、細菌感染、がん、炎症性疾患、または自己免疫疾患である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記被験体が、ヒトである、請求項 6 2 または 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記宿主細胞が、前記被験体にとって同種または自己である、請求項 6 2 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記被験体が、前記処置の後、低いレベルまたは軽度のサイトカイン放出症候群、低い

50

レベルまたは軽度の細胞関連脳症症候群、またはその両方を有するか、および／あるいは参照宿主細胞または組成物が投与された参照被験体と比較して、低減されたサイトカイン放出症候群、低減された細胞関連脳症症候群、またはその両方を有し、前記融合タンパク質は、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項62から65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

前記疾患が、がんである、請求項62から66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

前記がんが、固形腫瘍、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、腎臓がん、血液がん、前立腺がん、去勢抵抗性前立腺がん、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、膀胱がん、頭頸部がん、甲状腺がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、肺がん、尿路上皮がん、膵臓がん、膠芽腫、肝細胞がん、骨髄腫、多発性骨髄腫、白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄異形成症候群、脳がん、CNSがん、または悪性神経膠腫である、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

化学療法剤または免疫抑制成分の阻害剤を投与することをさらに含む、請求項62から68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

(a) 請求項46から48のいずれか一項に記載のベクターまたは発現構築物、および前記ベクターまたは前記発現構築物を宿主細胞に形質導入するための必要に応じた試薬；

(b) 請求項40から45のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド、および前記ポリヌクレオチドを宿主細胞に形質導入するための必要に応じた試薬；ならびに／あるいは

(c) 請求項49から60のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表に関する陳述

本出願に関連する配列表は、紙コピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、これにより参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は、360056__458WO__SEQUENCE__LISTING.txtである。テキストファイルは、274KBであり、これは、2019年2月20日に作成され、EFS-ウェブを介して電子的に提出された。

【0002】

政府の権利の陳述

本発明は、国立衛生研究所によって付与されたCA114536に基づく政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

がん抗原に対して標的化された遺伝子操作された受容体で改変されたT細胞を使用する養子免疫療法は、血液がんにおいて臨床上の成功を実証しており、他のがんおよび疾患の処置における将来性を示している。操作された受容体としては、キメラ抗原受容体(CAR)および強化された親和性T細胞受容体(TCR)が挙げられる。例えば、Harris and Kranz, Trends Pharmacol. Sci. 37(3):220 (2016)を参照されたい。操作された受容体のがん抗原と結合すると、改変されたT細胞は、標的腫瘍細胞の細胞溶解の誘発およびサイトカイン放出によって抗

腫瘍応答を媒介して、免疫応答を刺激する。

【0004】

抗原が駆動する刺激に加えて、CARおよびTCRはまた、T細胞において持続的（抗原非依存性または構成的な）または過剰なシグナル伝達を呈示することもある。操作された受容体の高い表面発現、自己凝集特性（例えば、scFvオリゴマー化）、ガンマレトロウイルスベクターにおける発現、およびある特定の共刺激シグナル伝達ドメインの存在は、持続的および／または過剰なシグナル伝達に寄与する可能性がある（Gomes-Silva et al., Cell Reports 21:17-26 (2017) ; Long et al., Nat. Med. 21:581-590 (2015) ; Frigault et al., Cancer Immunol. Res. 3:356-367 (2015)）。持続的および／または過剰なシグナル伝達は、形質導入されたT細胞の構成的な活性化および増殖をもたらし、T細胞分化を促進し、T細胞の存続を制限し、T細胞の消耗を増加させ、T細胞のアポトーシスを増加させ、免疫チェックポイント分子受容体（例えば、PD-1、TIM-3、およびLAG-3）の発現を増加させ、および／またはT細胞の抗腫瘍活性を減少させる可能性がある（Gomes-Silva et al., supra; Frigault et al., supra; Long et al., supra; Eyquem et al., Nature 543:113 (2017)）。 10

【0005】

さらに、CAR T細胞療法はまた、サイトカイン放出症候群（CRS）およびCAR T細胞関連脳症症候群（CREST）を含む顕著な毒性にも関連する。サイトカイン放出症候群は、T細胞の活性化および増殖に伴う上昇したレベルのサイトカインによって生じる全身性炎症性応答を指す。CRSは、発熱や筋肉痛の症状を伴う軽度で自己限定性の場合もあれば、または血管漏出、低血圧、呼吸器および腎機能不全、血球減少症、凝固障害、多臓器不全、ならびに神経学的な毒性などの症状を伴うより重度の場合もある。神経学的な毒性は、発作、せん妄、失語、および幻覚などの様々な神経学的および精神医学的な症状として生じる可能性がある。CRESTは、CRSと同時に、またはその後起こる可能性があり、致死的な脳浮腫を引き起こす場合がある。 20

【0006】

したがって、がんを処置するための養子細胞療法における新しい戦略が必要である。ここで開示された実施形態は、これらの必要性に取り組むものであり、他の関連の利点を提供する。 30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Gomes-Silvaら、Cell Reports (2017) 21:17~26

【非特許文献2】Longら、Nat. Med. (2015) 21:581~590

【非特許文献3】Frigaultら、Cancer Immunol. Res. (2015) 3:356~367 40

【非特許文献4】Eyquemら、Nature (2017) 543:113

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1A】図1A~1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag（登録商標）II（STII）タグを含むことにより、キメラ抗原受容体（CAR）シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A：細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv（配列番号8）またはROR1特異的R12 scFv（配列番号9）のいずれかを含有していた。図1B：STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR 50

T細胞の概略図。図1C：CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E：代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色（D）および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定（E）を示す。点線：CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線：4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム：アイソタイプ対照。図1F：代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G：様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562（K562/ROR1）細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞（4-1BB/CD3ζ）から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物をPLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C～1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1B】図1A～1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag（登録商標）II（STII）タグを含むことにより、キメラ抗原受容体（CAR）シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A：細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv（配列番号8）またはROR1特異的R12 scFv（配列番号9）のいずれかを含有していた。図1B：STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C：CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E：代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色（D）および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定（E）を示す。点線：CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線：4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム：アイソタイプ対照。図1F：代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G：様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562（K562/ROR1）細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞（4-1BB/CD3ζ）から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物をPLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C～1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1C】図1A～1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag（登録商標）II（STII）タグを含むことにより、キメラ抗原受容体（CAR）シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A：細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv（配列番号8）またはROR1特異的R12 scFv（配列番号9）のいずれかを含有していた。図1B：STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C：CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E：代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色（D）および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定（E）を示す。点線：CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線：4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム：アイソタイプ対照。図1F：代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G：様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入された

10

20

30

40

50

K562 (K562/ROR1) 細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞 (4-1BB/CD3ζ) から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物を PLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C~1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1D】図1A~1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag (登録商標) II (STII) タグを含むことにより、キメラ抗原受容体 (CAR) シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A: 細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv (配列番号8) またはROR1特異的R12 scFv (配列番号9) のいずれかを含有していた。図1B: STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C: CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E: 代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色 (D) および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定 (E) を示す。点線: CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線: 4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム: アイソタイプ対照。図1F: 代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G: 様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562 (K562/ROR1) 細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞 (4-1BB/CD3ζ) から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物を PLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C~1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1E】図1A~1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag (登録商標) II (STII) タグを含むことにより、キメラ抗原受容体 (CAR) シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A: 細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv (配列番号8) またはROR1特異的R12 scFv (配列番号9) のいずれかを含有していた。図1B: STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C: CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E: 代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色 (D) および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定 (E) を示す。点線: CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線: 4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム: アイソタイプ対照。図1F: 代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G: 様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562 (K562/ROR1) 細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞 (4-1BB/CD3ζ) から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物を PLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C~1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1F】図1A~1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag (登録商標) II (STII) タグを含むことによ

10

20

30

40

50

り、キメラ抗原受容体（CAR）シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A：細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv（配列番号8）またはROR1特異的R12 scFv（配列番号9）のいずれかを含有していた。図1B：STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C：CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E：代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色（D）および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定（E）を示す。点線：CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線：4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム：アイソタイプ対照。図1F：代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G：様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562（K562/ROR1）細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞（4-1BB/CD3ζ）から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物をPLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C～1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図1G】図1A～1Gは、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARのスペーサー領域にStreptag（登録商標）II（STII）タグを含むことにより、キメラ抗原受容体（CAR）シグナル伝達を活性化するための正確な方法が提供されることを示す。図1A：細胞外ヒンジ中に単一のSTII配列を取り込んだSTII CAR設計の概略図。CARは、CD19特異的FMC63 scFv（配列番号8）またはROR1特異的R12 scFv（配列番号9）のいずれかを含有していた。図1B：STII mAbでコーティングされたSTII磁気ビーズに結合したSTII CAR T細胞の概略図。図1C：CD19⁺LCL拡大増殖の後の選別精製したCD19特異的CAR T細胞の代表的なFACSプロット。図1Dおよび1E：代表的なFACSプロットは、細胞表面CARのSTII染色（D）および拡大増殖後の選別精製したCD19特異的またはROR1特異的CAR T細胞の表現型決定（E）を示す。点線：CD28/CD3ζ CAR T細胞、実線：4-1BB/CD3ζ CAR T細胞、影を付けたヒストグラム：アイソタイプ対照。図1F：代表的なFACSプロットは、CAR T細胞のDNA含量の染色を示す。ゲートは、細胞の頻度をG₀/G₁で定量化する。図1G：様々な量のSTII磁気ビーズ、K562細胞、またはROR1が形質導入されたK562（K562/ROR1）細胞との45分の共培養後における、CAR T細胞（4-1BB/CD3ζ）から調製された溶解産物のウェスタンブロット分析。溶解産物をPLC-γ1 pY783、PLC-γ1、SLP-76 pS376、SLP-76、CD247 pY142、およびCD247に対してプロットした。図1C～1Fのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図1Gのプロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【0009】

【図2-1】図2A～2Gは、CARリントンパク質シグナル伝達の定量分析を描写し、これは、CARが内因性T細胞シグナル伝達タンパク質を介してシグナル伝達することを示す。図2Aおよび2B：CAR T細胞の刺激条件および実験設計。図2C：棒グラフは、図2Aおよび2Bに記載される3つの質量分析（MS）実験で同定された固有なホスホセリン（「pS」）、ホスホスレオニン（「pT」）およびホスホチロシン（「pY」）部位の総数を示す。図2D：全てのMS実験で検出されたPO₄部位間のオーバーラップを示すベン図。図2Eおよび2F：散布ドットプロットは、10分（E）および45分（F）のCAR刺激後における基準のTCRシグナル伝達PO₄事象のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。図2G：CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ C

A R T細胞の10および45分の刺激からの溶解産物のウェスタンブロット分析。ブロットは、図2Aおよび2Bに記載される3つの独立した実験の代表的なものである。

【図2-2】図2A~2Gは、CARリントキシン受容体シグナル伝達の定量分析を描写し、これは、CARが内因性T細胞シグナル伝達タンパク質を介してシグナル伝達することを示す。図2Aおよび2B：CAR T細胞の刺激条件および実験設計。図2C：棒グラフは、図2Aおよび2Bに記載される3つの質量分析(MS)実験で同定された固有なホスホセリン(「pS」)、ホスホスレオニン(「pT」)およびホスホチロシン(「pY」)部位の総数を示す。図2D：全てのMS実験で検出されたPO₄部位間のオーバーラップを示すベン図。図2Eおよび2F：散布ドットプロットは、10分(E)および45分(F)のCAR刺激後における基準のTCRシグナル伝達PO₄事象のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。図2G：CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の10および45分の刺激からの溶解産物のウェスタンブロット分析。ブロットは、図2Aおよび2Bに記載される3つの独立した実験の代表的なものである。

10

【図2-3】図2A~2Gは、CARリントキシン受容体シグナル伝達の定量分析を描写し、これは、CARが内因性T細胞シグナル伝達タンパク質を介してシグナル伝達することを示す。図2Aおよび2B：CAR T細胞の刺激条件および実験設計。図2C：棒グラフは、図2Aおよび2Bに記載される3つの質量分析(MS)実験で同定された固有なホスホセリン(「pS」)、ホスホスレオニン(「pT」)およびホスホチロシン(「pY」)部位の総数を示す。図2D：全てのMS実験で検出されたPO₄部位間のオーバーラップを示すベン図。図2Eおよび2F：散布ドットプロットは、10分(E)および45分(F)のCAR刺激後における基準のTCRシグナル伝達PO₄事象のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。図2G：CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の10および45分の刺激からの溶解産物のウェスタンブロット分析。ブロットは、図2Aおよび2Bに記載される3つの独立した実験の代表的なものである。

20

【図2-4】図2A~2Gは、CARリントキシン受容体シグナル伝達の定量分析を描写し、これは、CARが内因性T細胞シグナル伝達タンパク質を介してシグナル伝達することを示す。図2Aおよび2B：CAR T細胞の刺激条件および実験設計。図2C：棒グラフは、図2Aおよび2Bに記載される3つの質量分析(MS)実験で同定された固有なホスホセリン(「pS」)、ホスホスレオニン(「pT」)およびホスホチロシン(「pY」)部位の総数を示す。図2D：全てのMS実験で検出されたPO₄部位間のオーバーラップを示すベン図。図2Eおよび2F：散布ドットプロットは、10分(E)および45分(F)のCAR刺激後における基準のTCRシグナル伝達PO₄事象のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。図2G：CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の10および45分の刺激からの溶解産物のウェスタンブロット分析。ブロットは、図2Aおよび2Bに記載される3つの独立した実験の代表的なものである。

30

【図2-5】図2A~2Gは、CARリントキシン受容体シグナル伝達の定量分析を描写し、これは、CARが内因性T細胞シグナル伝達タンパク質を介してシグナル伝達することを示す。図2Aおよび2B：CAR T細胞の刺激条件および実験設計。図2C：棒グラフは、図2Aおよび2Bに記載される3つの質量分析(MS)実験で同定された固有なホスホセリン(「pS」)、ホスホスレオニン(「pT」)およびホスホチロシン(「pY」)部位の総数を示す。図2D：全てのMS実験で検出されたPO₄部位間のオーバーラップを示すベン図。図2Eおよび2F：散布ドットプロットは、10分(E)および45分(F)のCAR刺激後における基準のTCRシグナル伝達PO₄事象のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。図2G：CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の10および45分の刺激からの溶解産物のウェスタンブロット分析。ブロットは、図2Aおよび2Bに記載される3つの独立した実験の代表的なものである。

40

【0010】

【図3A】図3A~3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A~3D：ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるM

50

Sによって同定された PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性 PO_4 部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E:45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を比較する散布プロット。格子(点線で定義される;垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされた PO_4 部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を意味する。図3F:散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおける PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率の平均および範囲を示す。

【図3B】図3A~3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A~3D:ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるMSによって同定された PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性 PO_4 部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E:45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を比較する散布プロット。格子(点線で定義される;垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされた PO_4 部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を意味する。図3F:散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおける PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率の平均および範囲を示す。

【図3C】図3A~3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A~3D:ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるMSによって同定された PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性 PO_4 部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E:45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を比較する散布プロット。格子(点線で定義される;垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされた PO_4 部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を意味する。図3F:散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおける PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率の平均および範囲を示す。

【図3D】図3A~3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A~3D:ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるMSによって同定された PO_4 部位の $\log_2$ 変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性 PO_4 部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E:45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性 PO_4 部位を比較する散布プロット。格子

10

20

30

40

50

(点線で定義される；垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下の部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされたPO₄部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性PO₄部位を意味する。図3F：散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおけるPO₄部位のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。

【図3E】図3A～3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A～3D：ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるMSによって同定されたPO₄部位のlog₂変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。Limmaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性PO₄部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E：45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性PO₄部位を比較する散布プロット。格子(点線で定義される；垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下の部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされたPO₄部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性PO₄部位を意味する。図3F：散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおけるPO₄部位のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。

【図3F】図3A～3Fは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、異なる動態および強度で類似のタンパク質リン酸化事象をモジュレートすることを示す。図3A～3D：ボルケーノプロットは、2つまたはそれより多くの実験におけるMSによって同定されたPO₄部位のlog₂変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。Limmaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たすCAR刺激応答性PO₄部位(ボルケーノプロットの左上(C、D)および右上(A、C、D)部分における灰色のドット)を定義した。図3E：45分の時点におけるCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激応答性PO₄部位を比較する散布プロット。格子(点線で定義される；垂直の「0」の線上の灰色のドットを含む)の中央の上および中央の下の部分における灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってより強くモジュレートされたPO₄部位を意味する。格子の右下および左上部分における薄灰色のドットは、4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって逆方向にモジュレートされたCD28/CD3ζ CAR刺激応答性PO₄部位を意味する。図3F：散布ドットプロットは、CAR刺激後の公知のCD28および4-1BBシグナル伝達経路メンバーにおけるPO₄部位のlog₂変化倍率の平均および範囲を示す。

【0011】

【図4】図4は、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激が、類似のシグナル伝達経路および細胞区画にわたりタンパク質リン酸化を変更することを示す。全てのMS実験の分析からの45分のCAR T細胞刺激後における差次的にリン酸化された、選択されたタンパク質のマップ。

【0012】

【図5-1】図5A～5Cは、CD28/CD3ζ CAR刺激が、タンパク質PO₄において4-1BB/CD3ζ CAR刺激より大きい規模の変化を生じることを示す。図5A：ドットプロットは、CAR刺激後に20種の最もリン酸化された部位間の平均log₂変化倍率を示す。図5B：ドットプロットは、CAR刺激後に公知のKEGG TCRシグナル伝達経路タンパク質で検出された各PO₄部位の絶対log₂変化倍率を示す。絶対log₂変化倍率を使用して、CAR活性化の後に一部の部位が脱リン酸化されたため、PO₄変更の規模を定量化した。図5C：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズ

で刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図5Aおよび5BのP値を、対応のない2つの試料のt検定を使用して計算した。

【図5-2】図5A~5Cは、CD28/CD3ζ CAR刺激が、タンパク質PO₄において4-1BB/CD3ζ CAR刺激より大きい規模の変化を生じることを示す。図5A：ドットプロットは、CAR刺激後に20種の最もリン酸化された部位間の平均log₂変化倍率を示す。図5B：ドットプロットは、CAR刺激後に公知のKEGG TCRシグナル伝達経路タンパク質で検出された各PO₄部位の絶対log₂変化倍率を示す。絶対log₂変化倍率を使用して、CAR活性化の後に一部の部位が脱リン酸化されたため、PO₄変更の規模を定量化した。図5C：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図5Aおよび5BのP値を、対応のない2つの試料のt検定を使用して計算した。

【0013】

【図6-1】図6A~6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、*in vivo*の抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A~6B：棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C：ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。Limaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D：棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KLIF2、およびFOXO4発現のlog₂変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E：代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F：棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=3~4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、p<0.05を意味する。図6G：FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H：Raji/fflu生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析(3.0×10⁶個の細胞、左、または7.5×10⁵個のT細胞、右)。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I：代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン(s/p/cm²/sr)を示す。図6J~6K：棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髄または末梢血液におけるCAR T細胞頻度(J)、または骨髄のCAR T細胞におけるPD-1、Lag-3、またはTim-3発現の平均蛍光強度(MFI)(K)を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側スチューデントt検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H~6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-2】図6A~6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、*in vivo*の抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A~6B：棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C：ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率(F

DR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D:棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3 ζ および4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KL F2、およびFOXO4発現の $\log_2$ 変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E:代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F:棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=3~4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、 $p<0.05$ を意味する。図6G:FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H:Raji/ffluc生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析(3.0×10^6 個の細胞、左、または 7.5×10^5 個のT細胞、右)。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I:代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン(s/p/cm²/sr)を示す。図6J~6K:棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髓または末梢血液におけるCAR T細胞頻度(J)、または骨髓のCAR T細胞におけるPD-1、Lag-3、またはTim-3発現の平均蛍光強度(MFI)(K)を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側スチューデントt検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H-6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-3】図6A~6Kは、CD28/CD3 ζ CARシグナルが、in vivoの抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A~6B:棒グラフは、CD28/CD3 ζ または4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均 $\log_2$ 変化倍率値を示す。図6C:ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3 ζ を4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現の $\log_2$ 変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。L i m m aを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D:棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3 ζ および4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KL F2、およびFOXO4発現の $\log_2$ 変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E:代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F:棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=3~4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、 $p<0.05$ を意味する。図6G:FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H:Raji/ffluc生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析(3.0×10^6 個の細胞、左、または 7.5×10^5 個のT細胞、右)。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I:代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン(s/p/cm²/sr)を示す。図6J~6K:棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髓または末梢血液におけるCAR T細胞頻度(J)、または骨髓のCAR T細胞

胞におけるPD-1、LAG-3、またはTIM-3発現の平均蛍光強度(MFI)(K)を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側学生t検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H-6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-4】図6A~6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、*in vivo*の抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A~6B:棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C:ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。Limaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D:棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KLIF2、およびFOXO4発現のlog₂変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E:代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F:棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=3~4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、p<0.05を意味する。図6G:FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H:Raji/ffluc生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析(3.0×10⁶個の細胞、左、または7.5×10⁵個のT細胞、右)。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I:代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン(s/p/cm²/sr)を示す。図6J~6K:棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髄または末梢血液におけるCAR T細胞頻度(J)、または骨髄のCAR T細胞におけるPD-1、LAG-3、またはTIM-3発現の平均蛍光強度(MFI)(K)を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側学生t検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H-6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-5】図6A~6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、*in vivo*の抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A~6B:棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C:ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率(FDR)を示す。Limaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D:棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KLIF2、およびFOXO4発現のlog₂変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E:代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F:棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=

3～4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、 $p < 0.05$ を意味する。図6G：FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H：Raji/fflucl生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析（ 3.0×10^6 個の細胞、左、または 7.5×10^5 個のT細胞、右）。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I：代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン（p/秒/cm²/sr）を示す。図6J～6K：棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髄または末梢血液におけるCAR T細胞頻度（J）、または骨髄のCAR T細胞におけるPD-1、Lag-3、またはTim-3発現の平均蛍光強度（MFI）（K）を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側スチューデントt検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H～6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-6】図6A～6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、in vivoの抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A～6B：棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C：ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率（FDR）を示す。Limaを使用して、log₂変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子（点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット）を定義した。図6D：棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KLIF2、およびFOXO4発現のlog₂変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化したn=3の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E：代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F：棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n=3～4つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、 $p < 0.05$ を意味する。図6G：FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H：Raji/fflucl生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析（ 3.0×10^6 個の細胞、左、または 7.5×10^5 個のT細胞、右）。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I：代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン（p/秒/cm²/sr）を示す。図6J～6K：棒グラフは、フローサイトメトリーによって測定した場合の、20日目における、骨髄または末梢血液におけるCAR T細胞頻度（J）、または骨髄のCAR T細胞におけるPD-1、Lag-3、またはTim-3発現の平均蛍光強度（MFI）（K）を示す。1群当たりn=5匹のマウス。対応のない両側スチューデントt検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H～6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【図6-7】図6A～6Kは、CD28/CD3ζ CARシグナルが、in vivoの抗腫瘍活性が低減したエフェクター細胞様の表現型を促進することを示す。図6A～6B：棒グラフは、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を制御するように刺激されたものと比較した、遺伝子発現における平均log₂変化倍率値を示す。図6C：ボルケーノプロットは、刺激されたCD28/CD3ζを4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較した、遺伝子発現のlog₂変化倍率および偽発見率（F

DR)を示す。Limmaを使用して、 $\log_2$ 変化倍率およびFDRカットオフを満たす差次的に発現された遺伝子(点線で定義されるグラフの左上および右上部分における灰色のドット)を定義した。図6D:棒グラフは、qPCRによって測定した場合の、CD28/CD3 ζ および4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞を比較したIL7R、KLIF2、およびFOXO4発現の $\log_2$ 変化倍率を示す。グラフは、単回のqPCR試行と一緒に定量化した $n=3$ の生物学的反復からの平均および標準偏差を描写する。図6E:代表的なFACSプロットは、ROR1特異的CAR T細胞とK562またはK562/ROR1細胞との5時間の共培養後におけるサイトカイン生産の細胞内染色を示す。図6F:棒グラフは、ROR1特異的CAR T細胞とK562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。 $n=3\sim 4$ つの独立した実験。*は、ウェルチのt検定により、 $p<0.05$ を意味する。図6G:FACSプロットは、STIIビーズでの刺激の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図6H:Raji/ffluc生着の7日後における、CAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析(3.0×10^6 個の細胞、左、または 7.5×10^5 個のT細胞、右)。1群当たり6、9、または15匹のマウスの生存分析は、2または3つの独立した実験からプールされる。図6I:代表的な生物発光画像は、示された時点におけるマウスの全ラジアン(s/p/cm²/sr)を示す。図6J~6K:棒グラフは、フローサイトメリーによって測定した場合の、20日目における、骨髄または末梢血液におけるCAR T細胞頻度(J)、または骨髄のCAR T細胞におけるPD-1、Lag-3、またはTim-3発現の平均蛍光強度(MFI)(K)を示す。1群当たり $n=5$ 匹のマウス。対応のない両側スチューデントt検定を使用して、群の平均を比較した。図6Gのデータは、4つの独立した実験の代表的なものである。図6H~6Kのデータは、2つの独立した実験の代表的なものである。

【0014】

【図7-1】図7A~7Hは、CD28/CD3 ζ CARが、内因性LckおよびCD28と差次的に会合すること、およびCD28ドメイン中のチロシンが、CD28/CD3 ζ CAR T細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図7Aおよび7B:静止(A)または刺激された(B)CAR T細胞からの全細胞溶解産物(L)および免疫沈降画分(IP)のウェスタンブロット分析。(A)のプロットは、3つの独立した実験の代表的なものである; (B)のプロットは、1つの実験の代表的なものである。図7C:CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図7D:FACSプロットは、K562/ROR1細胞との共培養の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図7E:棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。 $n=3$ つの独立した実験。図7F:静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物(L)および免疫沈降画分(IP)のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図7G:所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット。図7H:Raji/ffluc生着の7日後におけるCAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析。1群当たり6または15匹のマウスの生存分析は、2から3つの独立した実験からプールされる。

【図7-2】図7A~7Hは、CD28/CD3 ζ CARが、内因性LckおよびCD28と差次的に会合すること、およびCD28ドメイン中のチロシンが、CD28/CD3 ζ CAR T細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図7Aおよび7B:静止(A)または刺激された(B)CAR T細胞からの全細胞溶解産物(L)および免疫沈降画分(IP)のウェスタンブロット分析。(A)のプロットは、3つの独立した実験の代表的なものである; (B)のプロットは、1つの実験の代表的なものである。図7C:CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図7D:FACSプロットは、K562/ROR1細胞との共培養の72時間後にCFSE

色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図7E：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n = 3つの独立した実験。図7F：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図7G：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット。図7H：Raji/fflucl生着の7日後におけるCAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析。1群当たり6または15匹のマウスの生存分析は、2から3つの独立した実験からプールされる。

【図7-3】図7A～7Hは、CD28/CD3ζ CARが、内因性LckおよびCD28と差次的に会合すること、およびCD28ドメイン中のチロシンが、CD28/CD3ζ CAR T細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図7Aおよび7B：静止（A）または刺激された（B）CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。（A）のプロットは、3つの独立した実験の代表的なものである；（B）のプロットは、1つの実験の代表的なものである。図7C：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図7D：FACSプロットは、K562/ROR1細胞との共培養の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図7E：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n = 3つの独立した実験。図7F：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図7G：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット。図7H：Raji/fflucl生着の7日後におけるCAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析。1群当たり6または15匹のマウスの生存分析は、2から3つの独立した実験からプールされる。

【図7-4】図7A～7Hは、CD28/CD3ζ CARが、内因性LckおよびCD28と差次的に会合すること、およびCD28ドメイン中のチロシンが、CD28/CD3ζ CAR T細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図7Aおよび7B：静止（A）または刺激された（B）CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。（A）のプロットは、3つの独立した実験の代表的なものである；（B）のプロットは、1つの実験の代表的なものである。図7C：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図7D：FACSプロットは、K562/ROR1細胞との共培養の72時間後にCFSE色素希釈によって測定した場合のCAR T細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図7E：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n = 3つの独立した実験。図7F：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図7G：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット。図7H：Raji/fflucl生着の7日後におけるCAR T細胞の単回の輸注で処置されたNSGマウスの生存分析。1群当たり6または15匹のマウスの生存分析は、2から3つの独立した実験からプールされる。

【図7-5】図7A～7Hは、CD28/CD3ζ CARが、内因性LckおよびCD28と差次的に会合すること、およびCD28ドメイン中のチロシンが、CD28/CD3ζ CAR T細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図7Aおよび7B：静止（A）または刺激された（B）CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。（A）のプロットは、3つの独立した実験の代表的なものである；（B）のプロットは、1つの実験の代表的なものである。図7C：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図

7 D : F A C S プロットは、K 5 6 2 / R O R 1 細胞との共培養の 7 2 時間後に C F S E 色素希釈によって測定した場合の C A R T 細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図 7 E : 棒グラフは、K 5 6 2 / R O R 1 細胞との共培養の 2 4 時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n = 3 つの独立した実験。図 7 F : 静止 C A R T 細胞からの全細胞溶解産物 (L) および免疫沈降画分 (I P) のウェスタンブロット分析。プロットは、3 つの独立した実験の代表的なものである。図 7 G : 所与の時間にわたり S T I I 磁気ビーズで刺激された C A R T 細胞のウェスタンブロット。図 7 H : R a j i / f f l u c 生着の 7 日後における C A R T 細胞の単回の輸注で処置された N S G マウスの生存分析。1 群当たり 6 または 1 5 匹のマウスの生存分析は、2 から 3 つの独立した実験からプールされる。

【図 7 - 6】図 7 A ~ 7 H は、C D 2 8 / C D 3 ζ C A R が、内因性 L c k および C D 2 8 と差次的に会合すること、および C D 2 8 ドメイン中のチロシンが、C D 2 8 / C D 3 ζ C A R T 細胞に関連する固有な特性に寄与することを示す。図 7 A および 7 B : 静止 (A) または刺激された (B) C A R T 細胞からの全細胞溶解産物 (L) および免疫沈降画分 (I P) のウェスタンブロット分析。 (A) のプロットは、3 つの独立した実験の代表的なものである ; (B) のプロットは、1 つの実験の代表的なものである。図 7 C : C A R C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメインになされたチロシン変異の概略図。図 7 D : F A C S プロットは、K 5 6 2 / R O R 1 細胞との共培養の 7 2 時間後に C F S E 色素希釈によって測定した場合の C A R T 細胞増殖を示す。ヒストグラムの線は、図の記号表で示される通りである。図 7 E : 棒グラフは、K 5 6 2 / R O R 1 細胞との共培養の 2 4 時間後におけるサイトカイン生産の変化倍率の平均および標準偏差を示す。n = 3 つの独立した実験。図 7 F : 静止 C A R T 細胞からの全細胞溶解産物 (L) および免疫沈降画分 (I P) のウェスタンブロット分析。プロットは、3 つの独立した実験の代表的なものである。図 7 G : 所与の時間にわたり S T I I 磁気ビーズで刺激された C A R T 細胞のウェスタンブロット。図 7 H : R a j i / f f l u c 生着の 7 日後における C A R T 細胞の単回の輸注で処置された N S G マウスの生存分析。1 群当たり 6 または 1 5 匹のマウスの生存分析は、2 から 3 つの独立した実験からプールされる。

【 0 0 1 5 】

【図 8 A】図 8 A ~ 8 B は、J u r k a t 細胞および初代 T 細胞における T C R シグナル伝達の質量分析が、タンパク質リン酸化における著しい差を明らかにすることを示す。図 8 A : 初代 C D 8 + T 細胞または J u r k a t 細胞を、マウス抗ヒト C D 3 ε m A b および抗マウス I g G で刺激するか、または抗マウス I g G 単独で処置することによって刺激されないままにした。図 8 B : 近位の T C R シグナル伝達経路における公知の P O 4 部位の l o g 2 変化倍率を示すヒートマップ。

【図 8 B】図 8 A ~ 8 B は、J u r k a t 細胞および初代 T 細胞における T C R シグナル伝達の質量分析が、タンパク質リン酸化における著しい差を明らかにすることを示す。図 8 A : 初代 C D 8 + T 細胞または J u r k a t 細胞を、マウス抗ヒト C D 3 ε m A b および抗マウス I g G で刺激するか、または抗マウス I g G 単独で処置することによって刺激されないままにした。図 8 B : 近位の T C R シグナル伝達経路における公知の P O 4 部位の l o g 2 変化倍率を示すヒートマップ。

【 0 0 1 6 】

【図 9】図 9 は、タンデム質量タグ (T M T) 試薬および多段階のホスホペプチド濃縮を使用したペプチド標識が、初代 C A R T 細胞におけるタンパク質リン酸化の詳細な分析を可能にすることを示す。例示的なホスホペプチド濃縮戦略の概略図を提供する。簡単に言えば、溶解産物を還元し、アルキル化し、トリプシンで消化し、次いで T M T 試薬で標識した。標識されたペプチドをプールし、ホスホチロシン (p T y r) ペプチドの免疫沈降に供した。L C - M S / M S のために溶出液を保持した。塩基性逆相液体クロマトグラフィー、それに続き固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) を使用したグローバルなホスホペプチド濃縮を使用して、フロースルーを 1 3 画分に分けた。次いで、全ての 1 4 個の濃縮画分 (1 つの p - T y r + 1 3 個の I M A C) を L C - M S / M

Sによって分析した。

【0017】

【図10】図10は、 PO_4 の $\log_2$ 変化倍率の要約統計量を示す。ヒストグラムは、3つの実験にわたる $\log_2$ 変化倍率（シミュレーションとそれに対する対照）値の分布を示す。標準偏差は、凡例に記載される。

【0018】

【図11-1】図11A～11Dは、CAR-Lckの会合が、部分的にCD28/CD3ζ CAR T細胞に関連するシグナル強度の増加に関与することを示す。図11A：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされた変異の概略図。図11B：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。図11C：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図11D：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後における平均サイトカイン濃度を示す。データは、2つの独立した実験の代表的なものである。

10

【図11-2】図11A～11Dは、CAR-Lckの会合が、部分的にCD28/CD3ζ CAR T細胞に関連するシグナル強度の増加に関与することを示す。図11A：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされた変異の概略図。図11B：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。図11C：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図11D：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後における平均サイトカイン濃度を示す。データは、2つの独立した実験の代表的なものである。

20

【図11-3】図11A～11Dは、CAR-Lckの会合が、部分的にCD28/CD3ζ CAR T細胞に関連するシグナル強度の増加に関与することを示す。図11A：CAR CD28共刺激シグナル伝達ドメインになされた変異の概略図。図11B：静止CAR T細胞からの全細胞溶解産物（L）および免疫沈降画分（IP）のウェスタンブロット分析。プロットは、2つの独立した実験の代表的なものである。図11C：所与の時間にわたりSTII磁気ビーズで刺激されたCAR T細胞のウェスタンブロット分析。プロットは、3つの独立した実験の代表的なものである。図11D：棒グラフは、K562/ROR1細胞との共培養の24時間後における平均サイトカイン濃度を示す。データは、2つの独立した実験の代表的なものである。

30

【発明を実施するための形態】

【0019】

本開示は、一般的に、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質（例えば、キメラ抗原受容体、キメラ共刺激受容体）に関する。ある特定の態様では、本開示は、標的抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外成分；改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内成分；および細胞外成分と細胞内成分との間に配置された疎水性部分を含む融合タンパク質であって、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質と比較した場合、融合タンパク質の機能的な活性（すなわち、本明細書で提供される1つまたは複数の機能的な活性）をモジュレートする少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、融合タンパク質を提供する。このような融合タンパク質、およびそれを発現する宿主細胞は、がんを処置するための、例えば養子免疫療法の方法において使用することができる。

40

【0020】

背景の目的で言えば、T細胞の特異性を再び方向付ける、および／または所望のエフェクター機能を促進する合成受容体が、がん、自己免疫、および感染のための免疫療法試薬として開発中である（Sadellain et al., Nature 545:42

50

3-431 (2017)。T細胞の特異性を再び方向付けること、および／または所望のエフェクター機能を促進することが可能な例示的な受容体としては、キメラ抗原受容体(CAR)、キメラケモカイン受容体、キメラ共刺激受容体、および操作されたT細胞受容体(TCR)が挙げられる。例えば、一部のCARは、細胞外抗原特異的単鎖可変(scFv)断片を、TCR活性化を模倣する細胞内T細胞シグナル伝達ドメインに連結することによって、T細胞の特異性を腫瘍細胞に対して再び方向付ける(van der Stegen et al., Nat Rev Drug Discov 14:499-509 (2015)。CARで改変されたT細胞は、様々な悪性疾患およびがんの処置に関する将来性が示されている(例えば、Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011); Maude et al., N Engl J Med 371:1507-1517 (2014); Davila et al., Sci Transl Med 6:224ra25 (2014); Lee et al., Lancet 385:517-528 (2015); Kochenderfer et al., J. Clin. Oncol. 33:540-549 (2015); Turtle et al., J. Clin. Invest. 126:2123-2138 (2016); Turtle et al., Sci Transl Med 8, 355ra116 (2016); Turtle et al., J. Clin. Oncol. 35:3010-3020 (2017)を参照)。

【0021】

TCR係合によって媒介されるT細胞活性化は、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含有するCD3 δ 、 ϵ 、 γ 、および ζ 鎖によって開始されるタンパク質リン酸化(PO₄)を引き起こす(Brownlie et al., Nature Reviews Immunology 13:257-269 (2013))。共刺激分子からトランスで送達されたPO₄シグナルと組み合わせられることによって、これらの事象は、T細胞転写プログラムを変更し、サイトカイン放出を促進し、増殖を誘導する(Kaech and Cui, Nature Reviews Immunology 12:749-761 (2012))。CARは、一般的に、CD28および／または4-1BB由来の共刺激ドメインを含む単鎖構築物中にCD3 ζ エンドドメインを含有する。CD28/CD3 ζ および4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞はどちらも、患者における腫瘍の処置において有効であるが、in vitroで、および前臨床マウスモデルで機能的な差を呈示する(Kalos et al., Sci Transl Med 3, 95ra73 (2011); van der Stegen et al., Nat Rev Drug Discov 14:499-509 (2015); Cherkassky et al., J. Clin. Invest. 126:3130-3144 (2016); Kawalekar et al., Immunity 44:380-390 (2016))。例えば、CD28/CD3 ζ CAR T細胞は、低レベルの持続的な(tonic)(抗原非依存性の)CD3 ζ リン酸化を呈示することが報告されており、4-1BB/CD3 ζ CAR T細胞と比較して持続的なシグナル伝達を呈示する可能性がより高いようである。持続的なCARシグナル伝達は、同族の抗原への結合と無関係の過剰なサイトカイン放出、限定的な存続、消耗、アポトーシス、免疫チェックポイント分子受容体の発現の増加、または抗腫瘍活性の減少などの、CAR T細胞に対して有害効果を有する可能性がある(Frigault et al., Cancer Immunol Res 3:356-367 (2015); Long et al., Nature Medicine 21:581-590 (2015))。

【0022】

本開示は、変更された場合、CARのCD3 ζ シグナル伝達ドメインの持続的なリン酸化および／または内因性T細胞シグナル伝達分子との会合を改変するある特定のアミノ酸残基の1つまたは複数における変更を有するCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含有

する融合タンパク質を提供する。さらに、本開示の改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含むCARは、野生型CD28共刺激ドメインを含有するものと比較して、サイトカイン生産の低減したレベルを呈示し、それにより、CAR T細胞療法の臨床上の毒性（例えば、サイトカイン放出症候群またはCAR T細胞関連脳症症候群）を低減することができる。

【0023】

本開示をより詳細に記載する前に、本明細書において使用されるある特定の用語の定義を提供することが、その理解にとって有用であり得る。追加の定義は、この開示の全体にわたり記載される。

【0024】

本発明の記載において、あらゆる濃度の範囲、パーセンテージの範囲、比率の範囲、または整数の範囲は、別段の指定がない限り、列举された範囲内のあらゆる整数値、および適切な場合はそれらの分数（例えば整数値の10分の1および100分の1）を含むことが理解されるものとする。また、あらゆる物理的な特徴、例えばポリマーのサブユニット、サイズまたは厚さに関する本明細書で列举されたあらゆる数値範囲も、別段の指定がない限り、列举された範囲内のあらゆる整数を含むことが理解されるものとする。用語「約」は、本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、示された範囲、値、または構造の±20%を意味する。用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、本明細書で使用される場合、列举された要素の「1つまたは複数」を指すことが理解されるものとする。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のいずれか一方、両方、またはそれらのあらゆる組合せを意味することが理解されるものとする。用語「含む(include)」、「有する」および「含む(comprise)」は、本明細書で使用される場合、同意語として使用され、これらの用語およびそれらの変化形は、非限定的と解釈されることが意図される。

【0025】

加えて、本明細書に記載される構造および置換基の様々な組合せから生じる個々の化合物または化合物の群は、各化合物または化合物の群が個々に記載されたのと同程度に本出願によって開示されることが理解されるものとする。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本開示の範囲内である。

【0026】

用語「から本質的になる」は、「含む」と同等ではなく、特定された物質もしくは工程、または特許請求された発明の基礎的な特徴に著しく影響を与えない物質もしくは工程を指す。例えば、タンパク質のドメイン、領域、モジュールもしくはカセット（例えば、結合ドメイン、ヒンジ領域、リンカーモジュール、タグカセット）またはタンパク質（1つまたは複数のドメイン、領域、モジュールまたはカセットを有していてもよい）は、ドメイン、領域、モジュール、カセットまたはタンパク質のアミノ酸配列が、組み合わせて、ドメイン、領域、モジュール、カセットまたはタンパク質の長さの最大で20%（例えば、最大で15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%または1%）に寄与し、ドメイン、領域、モジュール、カセットまたはタンパク質の活性（例えば、結合タンパク質またはタグカセットの標的結合親和性）に実質的に影響を与えない（すなわち、50%より多く活性を低減しないことであり、例えば、活性の低減が、40%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、または1%以下である）伸長、欠失、変異、またはそれらの組合せ（例えば、アミノもしくはカルボキシ末端における、またはドメイン間におけるアミノ酸）を含む場合、特定のアミノ酸配列「から本質的になる」。

【0027】

「融合タンパク質」は、少なくとも2つの別個のドメイン（例えば、抗原結合ドメインおよび改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン）を有する単鎖ポリペプチドを含み、これらのドメインは、天然で、タンパク質中に一緒に見出されない。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、PCRの使用、組換えによる操作などによって構築さ

10

20

30

40

50

れてもよいし、またはこのような融合タンパク質は、合成によって作製されてもよい。融合タンパク質はさらに、他の成分（例えば、共有結合で結合した）、例えばタグ、リンカー、形質導入マーカー、または生物活性分子を含有していてもよい。ある特定の実施形態では、融合結合タンパク質は、キメラ抗原受容体（CAR）、T細胞受容体ベースのCAR（TCR-CAR）、またはキメラ共刺激受容体（CCR）である。

【0028】

用語「キメラ抗原受容体」（CAR）は、本明細書で使用される場合、天然に存在しない配列で一緒に連結された2つまたはそれより多くの別個のドメインを含む融合タンパク質であって、細胞の表面上で発現される場合、受容体として機能することができ、抗原に特異的な抗原結合ドメインを含む細胞外成分；必要に応じた細胞外スペーサドメイン；疎水性部分または膜貫通ドメイン；および細胞内活性化ドメイン（例えば、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有T細胞活性化モチーフ）、細胞内共刺激ドメイン、またはその両方を含む細胞内成分を含む、融合タンパク質を指す。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達成分は、ITAM含有T細胞活性化ドメイン（例えば、CD3ζ）および細胞内共刺激ドメイン（例えば、CD28）を有する。ある特定の実施形態では、CARは、単一のポリペプチド鎖として合成されるか、または核酸分子によって単鎖ポリペプチドとしてコードされる。

【0029】

「キメラ共刺激受容体」（CCR）は、抗原結合ドメインを含む細胞外成分、必要に応じた細胞外スペーサドメイン、疎水性部分または膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内共刺激ドメインを含むが、細胞内活性化ドメイン（例えば、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有T細胞活性化モチーフ）を含まない融合タンパク質を指す。CCRは、単一のポリペプチド鎖として合成されてもよいし、または核酸分子によって単鎖ポリペプチドとしてコードされてもよい。ある特定の実施形態では、CCRは、ヘテロ二量体化ドメインをさらに含む。ヘテロ二量体化ドメインを含むCCR構築物は、細胞内活性化ドメイン（例えば、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有T細胞活性化モチーフ）および対応するヘテロ二量体化ドメインを含む第2のポリペプチドと宿主細胞中で共発現させることができる。ヘテロ二量体化剤（例えば、小分子）の投与は、CCRと細胞内活性化ドメインを含むポリペプチドとの、その対応するヘテロ二量体化ドメインを介した集合を容易にする。このような二重のポリペプチドヘテロ二量体化構築物は、「オンスイッチCAR」または「スプリットCAR」（例えば、Wu et al., Science 350: aab4077 (2015)を参照）と称することもでき、これらの構築物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0030】

「T細胞受容体ベースのキメラ抗原受容体」（TCR-CAR）は、抗原に特異的な可溶性T細胞受容体（TCR）を含む細胞外成分、疎水性部分または膜貫通ドメイン、および細胞内活性化ドメイン（例えば、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有T細胞活性化モチーフ）、細胞内共刺激ドメイン、またはその両方を含む細胞内成分を含むヘテロ二量体融合タンパク質を指す（例えば、Walseng et al., Scientific Reports 7: 10713, (2017)を参照；そのTCR-CAR構築物および方法は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）。ある特定の実施形態では、TCR-CARは、TCRα定常ドメインに連結されたTCRα鎖可変ドメイン（Vα）またはその部分を含む細胞外成分を含む第1のポリペプチド鎖；およびTCRβ鎖定常ドメインに連結されたTCRβ鎖可変ドメイン（Vβ）またはその部分を含む細胞外成分を含む第2のポリペプチド鎖；疎水性部分または膜貫通ドメイン、ならびに細胞内活性化ドメイン（例えば、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有T細胞活性化モチーフ）、細胞内共刺激ドメイン、またはその両方を含む細胞内成分を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、TCR-CARの細胞内シグナル伝達成分は、ITAM含有T細胞活性化ドメイン（例えば、CD3ζ）および細胞内共刺激ドメイン（例えば、CD28）を有する。ある特定の実施形態では、TCRα鎖定常ド

メイン（またはその部分）の細胞外部分およびTCR β 鎖定常ドメイン（またはその部分）の細胞外部分はどちらも、二量体化が増加するように、システイン残基が付加されるように改変されている。

【0031】

「単鎖TCR」（scTCRまたはscTv）は、可撓性リンカー（例えば、（Gly₄Ser）_{2~5}、例えば、配列番号175を有する）でTCR γ ドメインに連結されたTCR γ ドメインを含む細胞外成分を含む融合タンパク質を指す。scTCRは、リンカーがTCR γ ドメインのC末端をTCR β ドメインのN末端に接続するか、またはTCR γ ドメインのN末端をTCR β ドメインのC末端に接続するように配列できることが理解されるものとする。

10

【0032】

「結合ドメイン」（「抗原結合ドメイン」または「結合領域」または「結合部分」とも称される）は、本明細書で使用される場合、標的分子（例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、がん抗原、自己免疫疾患抗原、自己抗原）と、特異的に、および非共有結合によって会合する、一体化する、または結合する能力を有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質などの分子を指す。結合ドメインは、生体分子または目的の他の標的に対する、あらゆる天然に存在する、合成の、半合成の、または組換え生産された結合パートナーを含む。一部の実施形態では、結合ドメインは、抗原結合ドメインであり、例えば抗体もしくはT細胞受容体（TCR）またはそれらの機能的な結合ドメインもしくは抗原結合断片である。例示的な結合ドメインとしては、単鎖抗体可変領域（例えば、ドメイン抗体、sFv、scFv、Fab）、T細胞受容体（TCR）の抗原結合領域、例えば、単鎖TCR（scTCR）または可溶性TCR、受容体エクトドメイン、リガンド、または生体分子に結合する特異的な能力に関して選択された合成ポリペプチドが挙げられる。ある特定の実施形態では、結合ドメインは、CD8エクトドメインまたは細胞外ドメイン由来の結合ドメインでも、機能的なIgV様ドメインを含むそれらのいずれの部分でもない（すなわち、CD8 α 鎖またはCD8 β 鎖由来の抗原ペプチド：MHC複合体に特異的な結合ドメインではない）。CD8の2つのサブユニットであるCD8 α およびCD8 β が存在し、CD8補助受容体は、 α ホモ二量体または $\alpha\beta$ ヘテロ二量体として存在することができる。さらなる実施形態では、結合ドメインは、CD8 α 単量体、CD8 β 単量体、CD8 $\alpha\alpha$ ホモ二量体、またはCD8 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体エクトドメインまたは細胞外ドメイン由来の結合ドメインでも、機能的なIgV様ドメインを含むそれらのいずれの部分でもない。CD8 α への言及は、「基準の」ヒトCD8 α タンパク質（NP_001759.3）に加えて、膜貫通ドメインを含む内部セグメントが欠如しており、結果として分泌されたタンパク質を生じるスプライスアイソフォーム2（RefSeq NP_741969.1）、および代替のプロモーターおよび5'UTRを使用するスプライスアイソフォーム3（RefSeq NP_001139345.1）を含む。CD8 β への言及は、「基準の」ヒトCD8 β タンパク質（RefSeq NP_004922）に加えて、RefSeq NP_742099、RefSeq NP_742100、UniProt P10966-4、RefSeq NP_757362、UniProt P10966-7、UniProt P10966-8、およびRefSeq NP_001171571に対応するアイソフォーム2~8を含む。例示的なIgV様ドメインは、ヒト基準CD8 α タンパク質（配列番号43）のアミノ酸22~135およびヒト基準CD8 β タンパク質（配列番号44）のアミノ酸22~132に見出すことができる。ある特定の実施形態では、CD8結合ドメインは、TCRの環境で抗原ペプチド：MHC I複合体と結合し、これは、TCR（例えば、scTCRまたはTCRベースのCAR）由来の結合ドメインを含む、天然に存在する、組換え、または操作された、または他のあらゆる組換え結合分子であり得る。

20

30

40

【0033】

「特異的に結合する」は、本明細書で使用される場合、親和性または 10^5 M^{-1} に等しいかまたはそれより大きい K_a （すなわち、 $1/\text{M}$ の単位での特定の結合相互作用の平

50

平衡会合定数)で、結合ドメインまたはその融合結合タンパク質が、標的分子に会合または一体化するが、試料中の他のいずれの分子または成分と有意に会合または一体化しないことを指す。結合ドメイン(またはその融合結合タンパク質)は、「高親和性」結合ドメイン(またはその融合結合タンパク質)として、または「低い親和性」結合ドメイン(またはその融合結合タンパク質)として分類することができる。「高親和性」結合ドメインは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、または少なくとも 10^{13} M^{-1} の K_a を有する結合ドメインを指す。「低い親和性」結合ドメインは、最大 10^7 M^{-1} 、最大 10^6 M^{-1} 、最大 10^5 M^{-1} の K_a を有する結合ドメインを指す。代替として、親和性は、Mの単位での特定の結合相互作用の平衡解離定数(K_d)と定義される場合もある(例えば、 10^{-5} M から 10^{-13} M)。ある特定の実施形態では、結合ドメインは、「強化された親和性」を有していてもよく、これは、野生型(または親)結合ドメインより強い標的抗原への結合を有する選択または操作された結合ドメインを指す。例えば、強化された親和性は、標的抗原に対して野生型結合ドメインより高い K_a (平衡会合定数)に起因していてもよいし、または標的抗原に対して野生型結合ドメインのそれより低い K_d (解離定数)に起因していてもよいし、または標的抗原に対して野生型結合ドメインのそれより低いオフレート(K_{off})に起因していてもよい。

10

【0034】

ある特定の実施形態では、T細胞受容体、抗体、もしくは結合ドメインまたはそれらの断片は、「強化された親和性」を有していてもよく、これは、野生型(または親)結合ドメインより強い標的抗原への結合を有する選択または操作された受容体または結合ドメインを指す。例えば、強化された親和性は、標的抗原に対して野生型結合ドメインより高い K_a (平衡会合定数)に起因していてもよいし、標的抗原に対して野生型結合ドメインのそれより低い K_d (解離定数)に起因していてもよいし、標的抗原に対して野生型結合ドメインのそれより低いオフレート(k_{off})に起因していてもよいし、またはそれらの組合せであってもよい。ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質、例えばCARまたはTCRなどは、特定の宿主細胞、例えばT細胞における発現が強化されるようにコドン最適化されていてもよい(Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135 (2006))。

20

30

【0035】

特定の標的と特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための、加えて結合ドメインまたは融合タンパク質の親和性を決定するための様々なアッセイが公知であり、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、分析超遠心分離、分光法、表面プラズモン共鳴(Biacore(登録商標))分析、およびMHC四量体アッセイなどがある(例えば、Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660 (1949); Wilson, Science 295:2103 (2002); Wolff et al., Cancer Res. 53:2560 (1993); Altman et al., Science 274:94-96 (1996); ならびに米国特許第5,283,173号および5,468,614号、または等価物を参照)。

40

【0036】

「タグカセット」は、本明細書で使用される場合、目的のタンパク質に付着させた、目的のタンパク質に融合した、または目的のタンパク質の一部である固有なペプチド配列であって、異種または非内因性の同族の結合分子(例えば、受容体、リガンド、抗体、または他の結合パートナー)がそれに特異的に結合することが可能なものを指し、この場合、特に、タグを有するタンパク質が、タンパク質または他の材料の不均質な集団の一部である場合、またはタグを有するタンパク質を発現する細胞が、細胞の不均質な集団(例えば、末梢血液のような生体試料)の一部である場合、タグを有するタンパク質またはタグを有するタンパク質を発現する細胞を、検出する、同定する、単離する、または精製する、

50

追跡する、濃縮する、または標的化するのに、結合特性を使用することができる。ある特定の実施形態では、タグを有するタンパク質を発現する細胞は、異種または非内因性の同族の結合分子と接触させ、生体反応を誘導する、例えば細胞活性化、細胞増殖または細胞死を促進することができる。提供される融合結合タンパク質において、同族の結合分子と特異的に結合するタグカセットの能力は、標的分子に特異的に結合する結合ドメインの能力と異なるか、またはそれに加えられる。タグカセットは、一般的に、抗原結合分子ではなく、例えば、抗体でも TCR でもなく、それらの抗原結合性部位でもない。例示的なタグカセットは、本明細書で提供される。一部の実施形態では、タグカセットは、本開示の融合タンパク質の細胞外成分中に含まれ、例えば、結合ドメインと疎水性部分との間に、または結合ドメインポリペプチド（例えば、VH、VL、TCR α 、TCR β など）の N 10
末端または C 末端に配置されていてもよいし、または融合タンパク質の結合ドメイン内に（例えば、VH と VL との間、または TCR α と TCR β との間に）配置されていてもよく、ただしタグは、抗原への結合に干渉しないか、または実質的に干渉しない。

【0037】

「ヒンジ領域」または「ヒンジ」は、本明細書で使用される場合、（a）免疫グロブリンのヒンジ配列（例えば、免疫グロブリンのヒンジの上の領域およびコア領域で構成される）もしくはその機能的な断片もしくはバリエント、（b）IIC 型レクチンインタードメイン（ストーク）領域もしくはその機能的な断片もしくはバリエント、または（c）表面抗原分類（CD）分子ストーク領域もしくはその機能的なバリエントを指す。「野生型免疫グロブリンのヒンジ領域」は、本明細書で使用される場合、抗体の重鎖に見出される、CH1 ドメインと CH2 ドメインとの間に挿入され、それらを接続するか（IgG、IgA、および IgD の場合）、または CH1 ドメインと CH3 ドメインとの間に挿入され、それらを接続する（IgE および IgM の場合）、天然に存在する上および中央のヒンジアミノ酸配列を指す。ある特定の実施形態では、ヒンジ領域は、ヒトであり、特定の実施形態では、ヒト IgG のヒンジ領域を含む。IgG のヒンジ領域としては、IgG1 のヒンジ領域、IgG2 のヒンジ領域、IgG3 のヒンジ領域、または IgG4 のヒンジ領域のいずれか 1 つまたは複数が挙げられる。 20

【0038】

「疎水性部分」は、本明細書で使用される場合、細胞膜において熱力学的に安定な 3 次元構造を有し、一般的に約 15 アミノ酸から約 30 アミノ酸の長さの範囲を有するあらゆるアミノ酸配列を意味する。疎水性ドメインの構造は、アルファヘリックス、ベータバレル、ベータシート、ベータヘリックス、またはそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、疎水性部分は、膜貫通ドメインであり、例えば、CD8、CD28、または CD27 分子由来の膜貫通ドメインである。 30

【0039】

「免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）T細胞活性化ドメイン」は、本明細書で使用される場合、免疫細胞受容体または細胞表面マーカー上に天然に、または内因的に存在し、少なくとも 1 つの免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含有する細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分を指す。ITAM は、YXXL/I-X₆₋₈-YXXL/I（配列番号 42）の保存されたモチーフを指す（式中、X は、あらゆるアミノ酸（すなわち、ITAM の長さにわたり同一または異なるアミノ酸）である）。ある特定の実施形態では、ITAM シグナル伝達ドメインは、1、2、3、4 つ、またはそれより多くの ITAM を含有する。ITAM シグナル伝達ドメインは、抗原結合またはリガンド係合後に T 細胞活性化シグナル伝達を開始させることができる。ITAM シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI または Fc γ RI、FcR γ 2a、FcR γ 2b1、FcR γ 2a1、FcR γ 2b2、FcR γ 3a、FcR γ 3b、FcR β 1、Fc ϵ R のガンマ鎖）、ナチュラルキラー細胞受容体タンパク質（例えば、DAP12）、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、ならびに CD66d の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げら 40
50

れる。これらのITAM配列およびウイルス由来のもの（例えば、BLV gp30; EBV LMP2A）の例示的なアミノ酸配列は、Paul, Fundamental Immunology 307 (Wolters Kluwer; Lippincott; Wilkins & Wilkins; Seventh Ed., 2008に記載されている)。これらのITAMおよび機能的な断片ならびにそれらのバリエーションはまた、ここで開示された融合タンパク質および宿主細胞での使用も企図され、参照により本明細書に組み込まれる。

【0040】

「共刺激シグナル伝達ドメイン」は、本明細書で使用される場合、一次または典型的な（例えば、ITAMで駆動される）活性化シグナル（例えばCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインによって提供されるもの）と共に活性化されると、T細胞応答、例えばT細胞活性化、サイトカインの生産、増殖、分化、生存、エフェクター機能、またはそれらの組合せを促進または強化する、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分を指す。共刺激シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD28、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD226、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、LFA-1、LIGHT、SLP76、TRIM、ZAP70、CD5、BAFF-R、SLAMF7、Nkp80、CD160、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

【0041】

「CD28共刺激シグナル伝達ドメイン」は、本明細書で使用される場合、CD28の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分を指す。CD28は、全てのヒトCD4⁺T細胞およびヒトCD8⁺T細胞の約50%で構成的に発現される共刺激分子である (Linsley et al., Annu. Rev. Immunol. 11: 191-212 (1993); June et al., Immunol. Today 11: 211-16 (1990))。CD28は、TCRと協同して、一部の場合においてTCRライゲーション単独では達成できないT細胞活性化の閾値の低下をもたらすことが示されている「早期」共刺激分子であり、クローンの拡大増殖および分化に必要な生存の強化およびサイトカイン生産（例えば、IL-2）の増加をもたらす (Bour-Jordan et al., Immunol. Rev. 241: 180-205 (2011))。例示的な「野生型」または「内因性」ヒトCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。ヒトCD28共刺激シグナル伝達ドメインへの改変（例えば、アミノ酸置換）は、本明細書に記載される場合、配列番号1に記載の全長野生型ヒトCD28ポリペプチド配列中の位置を指す場合もある。

【0042】

抗体技術分野の当業者によって理解される用語はそれぞれ、本明細書において明示的に異なって定義されない限り、当技術分野において獲得された意味が与えられる。用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続した少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む無傷抗体（なお重鎖抗体は、軽鎖が欠如しているが、それでも用語「抗体」に包含されることが理解されるものとする）、加えて、標的分子と結合する能力を有するかまたは保持する無傷抗体の抗原結合性部位を指す。抗体としては、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体が挙げられる。抗体は、天然に存在する、組換え生産された、遺伝子操作された、または改変されたものであってもよく、その例としては、免疫グロブリンの改変された形態、例えばイントラボディ (intrabody)、ペプチボディ (peptibody)、ナノボディ (nanobody)、単一ドメイン抗体、および多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody)、テトラボディ (tetrabody)、タンデムジースCF

V、タンデムトリ- scFv)などが挙げられる。

【0043】

抗体由来の「結合断片」、「結合部分」、または「結合ドメイン」は、無傷抗体の一部を含み、抗体の抗原性を決定する可変領域または相補性決定領域を含有する「抗体断片」を指す。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体、scFv（すなわち、一般的に約10から約25アミノ酸の短いリンカーペプチドで接続された、免疫グロブリン(Ig)分子の可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)領域の融合タンパク質)、VHH、単ドメイン抗体（例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ）、ならびに抗体断片を含む多重特異性抗体が挙げられる。モノクローナル抗体またはその抗原結合性部位は、非ヒト、キメラ、ヒト化、またはヒトであってもよく、好ましくは、ヒト化またはヒトである。免疫グロブリンの構造および機能は、例えば、Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988)で総論されている。抗体は、IgGおよびそのサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgE、IgA、ならびにIgDなどの、あらゆるクラスまたはサブクラスに属するものであり得る。

10

【0044】

用語「可変軽鎖」(V_L)および「可変重鎖」(V_H)は、それぞれ抗体軽鎖および重鎖由来の可変結合領域を指す。可変結合領域は、「相補性決定領域」(CDR、HVR(高度可変領域)とも称される)および「フレームワーク領域」(FR)として公知の別々の明確に定義された部分領域で構成されている。CDRは、抗原特異性および/または結合親和性を付与し、FRによって隔てられている抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。各抗体軽鎖可変領域中に、3つのCDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)があり、各抗体重鎖可変領域中に、3つのCDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)がある。

20

【0045】

用語「CL」は、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体軽鎖由来の定常領域を指す。

30

【0046】

用語「CH」は、「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」を指し、これはさらに、抗体アイソタイプに応じて、CH1、CH2、およびCH3(IgA、IgD、IgG)、またはCH1、CH2、CH3、およびCH4ドメイン(IgE、IgM)に分けることができる。

【0047】

「Fab」(抗原結合断片(fragment antigen binding))は、抗原に結合する抗体の一部であり、その例としては、鎖間のジスルフィド結合を介して軽鎖に連結された重鎖の可変領域およびCH1が挙げられる。

【0048】

「Fc領域部分」は、本明細書で使用される場合、抗体由来のFc断片の重鎖定常領域セグメント(「結晶化可能な断片(fragment crystallizable)」領域またはFc領域)を指し、これは、1つまたは複数の定常ドメイン、例えばCH2、CH3、CH4、またはそれらのあらゆる組合せを含み得る。ある特定の実施形態では、Fc領域部分としては、IgG、IgA、もしくはIgD抗体のCH2およびCH3ドメイン、もしくはそれらのあらゆる組合せ、またはIgMもしくはIgE抗体のCH3およびCH4ドメイン、もしくはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。他の実施形態では、CH2CH3またはCH3CH4構造は、同じ抗体アイソタイプ由来の部分領域のドメインを有し、ヒトであり、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM(例えば、ヒトIgG1またはIgG4由

40

50

来のCH₂CH₃)である。

【0049】

背景の目的で言えば、Fc領域は、免疫グロブリンのエフェクター機能、例えばADCC（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害）、CDC（補体依存性細胞傷害）および補体結合、Fc受容体（例えば、CD16、CD32、FcRn）への結合、Fc領域が欠失したポリペプチドと比べてより長いin vivoでの半減期、プロテインA結合に参与し、さらには胎盤通過にも関与する可能性がある（Capon et al., Nature 337:525 (1989)を参照）。ある特定の実施形態では、本開示の融合結合タンパク質中に見出されるFc領域部分は、これらのエフェクター機能の1つまたは複数
10
を媒介することが可能であるか、または例えば当技術分野において公知の1つまたは複数の変異によって、これらの活性の1つまたは複数または全てを欠如していると予想される。例えば、Fcの機能性を改変する（例えば、改善する、低減する、または消失させる）ためのアミノ酸の改変（例えば、置換）としては、T250Q/M428L；M252Y/S254T/T256E；H433K/N434F；M428L/N434S；E233P/L234V/L235A/G236+A327G/A330S/P331S；E333A；S239D/A330L/I332E；P257I/Q311；K326W/E333S；S239D/I332E/G236A；N297Q；K322A；S228P；L235E+E318A/K320A/K322A；L234A/L235A；およびL234A/L235A/P329G変異が挙げられ、これらの変異は、InvivoGen（2011）によって公開された「Engineered Fc Regions」
20
に要約され、注釈がつけられており、www.invivogen.com/PDF/review/review-Engineered-Fc-Regions-invivogen.pdf?utm_source=review&utm_medium=pdf&utm_campaign=review&utm_content=Engineered-Fc-Regionsにおいてオンラインで入手可能であり、参照により本明細書に組み込まれる。

【0050】

「免疫系細胞」は、本明細書で使用される場合、2つの主要な系統、すなわち骨髄性前駆細胞（これは、骨髄性細胞、例えば単球、マクロファージ、樹状細胞、巨核球および顆粒球を生じる）およびリンパ前駆細胞（これは、リンパ系細胞、例えばT細胞、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞を生じる）を生じる、骨髄中の造血幹細胞に由来する免疫系のあらゆる細胞を意味する。例示的な免疫系細胞としては、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁻CD8⁻二重陰性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、調節性T細胞、幹細胞メモリーT細胞、ナチュラルキラー細胞、および樹状細胞が挙げられる。マクロファージおよび樹状細胞は、「抗原提示細胞」または「APC」と称することもでき、これらは、ペプチドと複合体化したAPCの表面上の主要組織適合複合体（MHC）受容体がT細胞の表面上のTCRと相互作用するとT細胞を活性化できる特殊化した細胞である。

【0051】

「T細胞」（または「Tリンパ球」）は、胸腺で成熟し、T細胞受容体（TCR）を生産する免疫系細胞であり、これは、例えば末梢血単核細胞（PBMC）から入手でき（濃縮または単離でき）、本明細書では「バルク」T細胞と称される。T細胞の単離の後、細胞傷害性（CD8⁺）およびヘルパー（CD4⁺）T細胞の両方は、拡大増殖の前または後のいずれかに、ナイーブ、メモリー、およびエフェクターT細胞の部分集団に選別することができる。T細胞は、ナイーブ（抗原に曝露されていない；T_{CM}と比較した場合、CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127、およびCD45RAの発現の増加、ならびにCD45ROの発現の減少）、メモリーT細胞（T_M）（抗原を経験した、寿命が長い）、およびエフェクター細胞（抗原を経験した、細胞傷害性）であり得る。T_Mはさらに、セントラルメモリーT細胞（T_{CM}、ナイーブT細胞と比較した場合、CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、およびCD95の発現の増加、ならびにCD54RAの発現の減少）、幹細胞メモリーT細胞、およびエフェクターメ
40
50

モリーT細胞 (T_{EM} 、ナイーブT細胞または T_{CM} と比較した場合、CD62L、CCR7、CD28、CD45RAの発現の減少、およびCD127の発現の増加)のサブセットに分けることができる。エフェクターT細胞 (T_E) は、 T_{CM} と比較した場合、CD62L、CCR7、CD28の発現が減少し、グランザイムおよびパーフォリンに関して陽性である、抗原を経験したCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球を指す。ヘルパーT細胞 (T_H) は、サイトカインを放出することによって他の免疫細胞の活性に影響を与えるCD4⁺細胞である。CD4⁺T細胞は、適応免疫応答を活性化および抑制することができ、どの作用が誘導されるかは、他の細胞およびシグナルの存在に依存すると予想される。T細胞は、公知の技術に従って収集でき、様々な部分集団またはそれらの組合せは、公知の技術によって、例えば抗体への親和性結合、フローサイトメトリー、または免疫磁気選択によって濃縮または枯渇させることができる。

10

【0052】

「T細胞受容体」(TCR)は、CD3に関連して、一般的に、主要組織適合複合体(MHC)分子に結合した抗原の認識に関与するT細胞(またはTリンパ球)の表面上で見出される分子を指す。ほとんどのT細胞において、TCRは、高度に可変の α および β 鎖(それぞれTCR α およびTCR β としても公知)のジスルフィド結合したヘテロ二量体を有する。T細胞のサブセットにおいて、TCRは、可変 γ および δ 鎖(それぞれTCR γ およびTCR δ としても公知)のヘテロ二量体で構成されている。TCRの各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端における短い細胞質テールを有する(Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照)。TCRは、本開示において使用される場合、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヤギ、ウマ、または他の哺乳動物を含む様々な動物種由来であってもよい。TCRは、細胞結合型であってもよいし(すなわち、膜貫通領域またはドメインを有する)、または可溶性の形態であってもよい。

20

【0053】

TCR α 鎖(V_α)および β 鎖(V_β)の、または $\gamma\delta$ TCRの場合は V_γ および V_δ の、用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、TCRの抗原への結合(例えば、ペプチド抗原:MHC複合体における)に関与するTCRの部分(例えば、ペプチド抗原:MHC複合体における)を指す。天然のTCRの V_α および V_β は、一般的に、類似の構造を有し、各可変ドメインは、4つの保存されたFRおよび3つのCDRを含む。 V_α ドメインは、2つの別個のDNAセグメント、可変遺伝子セグメントおよび連結遺伝子セグメント(joining gene segment)(V-J)によってコードされ; V_β ドメインは、3つの別個のDNAセグメント、可変遺伝子セグメント、多様性遺伝子セグメント、および連結遺伝子セグメント(V-D-J)によってコードされる。抗原結合特異性を付与するのに、単一の V_α または V_β ドメインが十分であり得る。さらに、特定の抗原と結合するTCRは、その抗原と結合するTCR由来の V_α または V_β ドメインを使用して単離でき、それぞれ相補的 V_α または V_β ドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。

30

40

【0054】

「主要組織適合複合体分子」(MHC分子)は、ペプチド抗原を細胞表面に送達する糖タンパク質を指す。MHCクラスI分子は、膜貫通 α 鎖(3つの α ドメインを有する)および非共有結合によって会合した β 2ミクログロブリンからなるヘテロ二量体である。MHCクラスII分子は、2つの膜貫通糖タンパク質、 α および β で構成され、これらはどちらも膜貫通型である。各鎖は、2つのドメインを有する。MHCクラスI分子は、サイトゾル中で生じたペプチドを細胞表面に送達し、そこでペプチド:MHC複合体は、CD8⁺T細胞によって認識される。MHCクラスII分子は、小胞系で生じたペプチドを細胞表面に送達し、そこでそれらは、CD4⁺T細胞によって認識される。MHC分子は、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物などの様々な動物種由来であり得る。

50

【0055】

「抗原」または「Ag」は、本明細書で使用される場合、免疫応答を引き起こす免疫原性分子を指す。この免疫応答は、抗体産生、特定の免疫担当細胞（例えば、T細胞）の活性化、またはその両方を含み得る。抗原（免疫原性分子）は、例えば、ペプチド、糖ペプチド、ポリペプチド、糖ポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖、脂質などであり得る。抗原は、合成でき、組換え生産でき、または生体試料から誘導できることが容易に理解される。1種または複数の抗原を含有し得る例示的な生体試料としては、組織試料、腫瘍試料、細胞、生体液、またはそれらの組合せが挙げられる。抗原は、抗原を発現するように改変または遺伝子操作された細胞、または内因的に（例えば、ヒトの介入による改変も遺伝子操作も含まない）免疫原性である変異または多型を発現する細胞によって生産することができる。融合タンパク質の結合ドメインが、T細胞受容体（TCR）由来の抗原結合領域（例えば、TCRV α およびV β ）を含むある特定の実施形態では、抗原は、ペプチド：MHC複合体を含み、結合ドメインは少なくともペプチドに接触する。

10

【0056】

用語「エピトープ」または「抗原エピトープ」は、同族の結合分子、例えば免疫グロブリン、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体、または他の結合分子、ドメインもしくは融合タンパク質によって認識され、それと特異的に結合するあらゆる分子、構造、アミノ酸配列またはタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、一般的に、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基を含有し、特異的な3次元構造の特徴に加えて、特異的な電荷の特徴を有し得る。

20

【0057】

「核酸」または「核酸分子」は、本明細書で使用される場合、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、または *in vitro* 翻訳によって生成した、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、それらの断片のいずれかを指し、さらに、ライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、またはエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生成した断片も指す。ある特定の実施形態では、本開示の核酸は、PCRによって生産される。核酸は、天然に存在するヌクレオチド（例えばデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド）、天然に存在するヌクレオチドのアナログ（例えば、天然に存在するヌクレオチドの α -鏡像異性体の形態）、またはその両方の組合せである単量体で構成されていてもよい。改変されたヌクレオチドは、糖部分、またはピリミジンもしくはプリン塩基部分中に改変を有していてもよいし、またはそれらが置き換えられていてもよい。核酸単量体は、ホスホジエステル結合またはこのような連結のアナログによって連結されていてもよい。ホスホジエステル結合のアナログとしては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート（phosphoroselenoate）、ホスホロジセレノエート（phosphorodiselenoate）、ホスホロアニロチオエート（phosphorothioate）、ホスホロアニリデート（phosphoranylidate）、ホスホルアミデートなどが挙げられる。核酸分子は、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。

30

【0058】

用語「単離された」は、物質が、その元の環境（例えば、それが天然に存在する場合、天然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きた動物中に存在する天然に存在する核酸またはポリペプチドは、単離されていないが、天然系において共存する物質の一部または全てから分離された同じ核酸またはポリペプチドは、単離されている。このような核酸は、ベクターの一部であってもよいし、および／またはこのような核酸またはポリペプチドは、組成物（例えば、細胞溶解産物）の一部であってもよく、それでもなお、このようなベクターまたは組成物は、核酸またはポリペプチドの天然環境の一部ではないという点で、これらは単離されている。用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖生産に関与するDNAのセグメントを意味し、遺伝子は、コード領域の前および後の領域（「リーダーおよびトレーラー」）、加えて個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（

40

50

イントロン)を含む。

【0059】

用語「構築物」は、組換え核酸分子を含有するあらゆるポリヌクレオチドを指す。構築物は、ベクター（例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター）中に存在していてもよいし、またはゲノムに組み込まれていてもよい。

【0060】

「ベクター」は、別の核酸を輸送することが可能な核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージ、RNAベクター、または染色体、非染色体、半合成もしくは合成の核酸分子を含み得る直鎖もしくは環状のDNAもしくはRNA分子であってもよい。例示的なベクターは、それが連結されている核酸分子の自律複製（エピソードベクター）または発現（発現ベクター）が可能なものである。

10

【0061】

「レトロウイルス」は、RNAゲノムを有するウイルスである。「ガンマレトロウイルス」は、レトロウイルス科の属を指す。例示的なガンマレトロウイルスとしては、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、およびトリ細網内皮症ウイルスが挙げられる。

【0062】

「レンチウイルス」は、分裂および非分裂細胞に感染することが可能なレトロウイルスの属を指す。レンチウイルスのいくつかの例としては、HIV（ヒト免疫不全ウイルス：HIV1型、およびHIV2型を含む）；ウマ伝染性貧血ウイルス；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；およびサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられる。

20

【0063】

「レンチウイルスベクター」は、本明細書で使用される場合、遺伝子送達のためのHIVベースのレンチウイルスベクターであって、組み込み型であっても非組み込み型であってもよく、比較的大きなパッケージング能力を有し、様々な異なる細胞型に形質導入できるものを意味する。レンチウイルスベクターは、通常、3種（パッケージング、エンベロープおよびトランスファー）またはそれより多くのプラスミドの産生細胞への一過性トランスフェクションの後、生成される。HIVのように、レンチウイルスベクターは、ウイルス表面糖タンパク質と細胞表面上の受容体との相互作用を介して標的細胞に侵入する。侵入のとき、ウイルスRNAは、ウイルス逆転写酵素複合体によって媒介される逆転写を受ける。逆転写産物は、二本鎖直鎖状のウイルスDNAであり、これは、感染細胞のDNAへのウイルス組み込みのための基質である。

30

【0064】

用語「動作可能に連結した」は、一つの核酸分子の機能が他のものの影響を受けるように、単一の核酸断片上で2つまたはそれより多くの核酸分子が会合していることを指す。例えば、プロモーターは、コード配列の発現に影響を与えることが可能である場合、そのコード配列と動作可能に連結している（すなわち、コード配列は、プロモーターの転写制御下である）。「非連結」は、会合した遺伝学的エレメントが、互いに近接して会合しておらず、一方の機能が他方に影響を与えないことを意味する。

40

【0065】

用語「発現」は、本明細書で使用される場合、核酸分子、例えば遺伝子のコード配列に基づきポリペプチドが生産されるプロセスを指す。このプロセスは、転写、転写後制御、転写後修飾、翻訳、翻訳後制御、翻訳後修飾、またはそれらのあらゆる組合せを含み得る。

【0066】

「発現ベクター」は、本明細書で使用される場合、好適な宿主中で核酸分子の発現を実行することが可能な好適な制御配列に動作可能に連結された核酸分子を含有するDNA構築物を指す。このような制御配列としては、転写を実行するためのプロモーター、このような転写を制御するための必要に応じたオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結

50

合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列が挙げられる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、ウイルスであってもよいし、または単に能力を有するゲノム挿入物であってもよい。好適な宿主に形質転換されたら、ベクターは、宿主ゲノムとは独立して複製および機能することができ、または一部の場合において、ゲノムそのものに組み込まれる場合もある。本明細書において、「プラスミド」、「発現プラスミド」、「ウイルス」および「ベクター」は、しばしば同義的に使用される。

【0067】

細胞に核酸分子を挿入する状況における用語「導入される」は、「トランスフェクション」、または「形質転換」、または「形質導入」を意味し、さらに、真核または原核細胞への核酸分子の取込みへの言及を含み、その場合、核酸分子は、細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアDNA）に取り込まれて、自律的なレプリコンに変換されるか、または一時的に発現させることができる（例えば、トランスフェクトされたmRNA）。

【0068】

「異種」核酸分子、構築物または配列は、本明細書で使用される場合、宿主細胞にとって天然ではないが、宿主細胞由来の核酸分子または核酸分子の一部に相同であり得る核酸分子または核酸分子の一部を指す。異種核酸分子、構築物または配列の供給源は、異なる属または種由来であってもよい。ある特定の実施形態では、異種核酸分子は、例えば、コンジュゲーション、形質転換、トランスフェクション、形質導入、電気穿孔などによって、宿主細胞または宿主ゲノムに付加され（すなわち、内因性でも天然でもない）、この場合、付加された分子は、宿主ゲノムに組み込まれる場合もあれば、または染色体外の遺伝物質として（例えば、プラスミドまたは自己複製ベクターの他の形態として）存在する場合もあり、複数のコピーで存在していてもよい。加えて、「異種」は、宿主細胞が相同なタンパク質または活性をコードしているとしても、宿主細胞に導入された、非天然の酵素、タンパク質、または非内因性核酸分子によってコードされた他の活性を指す。

【0069】

用語「相同な」または「相同体」は、宿主細胞、宿主種または宿主株に見出される、またはそれらに由来する分子または活性を指す。例えば、異種分子または異種分子をコードする遺伝子は、それぞれ異種分子をコードする天然の宿主または宿主細胞の分子または遺伝子に相同であってもよく、必要に応じて、変更された構造、配列、発現レベルまたはそれらの組合せを有していてもよい。

【0070】

用語「内因性」または「天然の」は、本明細書で使用される場合、通常、宿主または宿主細胞中に存在する遺伝子、タンパク質、化合物、分子または活性を指す。さらに、親遺伝子、タンパク質または活性と比較して、変異している、過剰発現される、シャッフルされる、二倍化される、またはそれ以外の方法で変更される遺伝子、タンパク質または活性は、それでもなお、その特定の宿主細胞にとって内因性または天然とみなされる。例えば、第1の遺伝子由来の内因性制御配列（例えば、プロモーター、翻訳を減衰させる配列）は、第2の天然の遺伝子または核酸分子の発現を変更または調節するのに使用でき、この場合、第2の天然の遺伝子または核酸分子の発現または調節は、親細胞における通常の発現または調節とは異なる。

【0071】

用語「操作された」、「組換え」、「改変された」または「非天然の」は、本明細書で使用される場合、異種核酸分子の導入によって改変された生物、微生物、細胞、核酸分子、またはベクターを指すか、またはヒトの介入により遺伝子操作された、すなわち異種核酸分子の導入によって改変された細胞または微生物を指すか、または内因性核酸分子または遺伝子の発現が、制御されるか、調節解除されるか、または構成的になるように変更された細胞または微生物を指し、この場合、このような変更または改変は、遺伝子操作によって導入することができる。ヒトによって生成された遺伝的変更としては、例えば、1つまたは複数のタンパク質、融合結合タンパク質、または酵素をコードする核酸分子を（こ

れは、発現制御エレメント、例えばプロモーターを含んでいてもよい）導入する改変、または他の核酸分子の付加、欠失、置換、または細胞の遺伝物質の他の機能的な破壊もしくは細胞の遺伝物質への付加を挙げることができる。例示的な改変としては、参照または親分子からの、異種または相同ポリペプチドのコード領域またはその機能的な断片における改変が挙げられる。追加の例示的な改変としては、例えば、非コード調節領域における改変が挙げられ、その改変によって遺伝子またはオペロンの発現が変更される。

【0072】

「変異」は、本明細書で使用される場合、それぞれ参照または野生型核酸分子またはポリペプチド分子と比較した場合の、核酸分子またはポリペプチド分子の配列における変化を指す。変異は、配列中に、ヌクレオチドまたはアミノ酸の置換、挿入または欠失などの数々の異なるタイプの変化を生じさせることができる。

10

【0073】

「配列同一性」は、本明細書で使用される場合、最大の配列同一性パーセントを達成するために配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入した後の、配列同一性の一部としていずれの保存的置換（アミノ酸配列の場合）も考慮に入れない、1つの配列中における、別の参照ポリペプチド（またはヌクレオチド）配列中のアミノ酸残基（またはヌクレオチド）と同一なアミノ酸残基（またはヌクレオチド）のパーセンテージを指す。配列同一性のパーセンテージ値は、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)によって定義されたNCBI BLAST 2.0ソフトウェアをデフォルト値に設定されたパラメーターで使用して得ることができる。

20

【0074】

「養子細胞免疫療法」または「養子免疫療法」は、天然に存在する、または遺伝子操作された疾患抗原特異的免疫細胞（例えば、T細胞）の投与を指す。養子細胞免疫療法は、自己（免疫細胞がレシピエント由来である）、同種（免疫細胞が同じ種のドナー由来である）または同系（免疫細胞が、レシピエントに遺伝学的に同一なドナー由来である）であってもよい。

【0075】

「処置する」または「処置」または「好転させる (ameliorate)」は、被験体（例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば霊長類、ウマ、イヌ、マウス、ラット）の疾患、障害、または状態の医学的管理を指す。一般的に、本開示の標的抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外成分、および改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内成分、および細胞外成分と細胞内成分との間に配置された疎水性部分を含む融合結合タンパク質を発現する宿主細胞を含む適切な用量または処置レジメンは、治療または予防の利益を惹起するのに十分な量で投与される。治療または予防／防止的な利益としては、臨床転帰の改善；疾患に関連する症状の低減または軽減；症状の出現の減少；生活の質の改善；より長い無病状態；疾患の程度の減縮、病態の安定化；疾患進行の遅延；寛解；生存；生存の延長；またはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

30

【0076】

本開示の融合結合タンパク質または融合結合タンパク質を発現する細胞の「治療有効量」または「有効量」は、統計学的に有意な方式での処置されている疾患の1つまたは複数の症状の好転をもたらすのに十分な化合物または細胞の量を指す。単独で投与される個々の活性成分または単一の活性成分を発現する細胞に対して言及される場合、治療有効用量は、その成分またはその成分を発現する細胞単独での作用を指す。組合せに対して言及される場合、治療有効用量は、逐次的に投与されるか、または同時に投与されるかにかかわらず、活性成分または組み合わされた補助的な活性成分と、活性成分を発現する細胞との、治療作用をもたらす組み合わされた量を指す。別の組合せは、1種より多くの活性成分、例えば2種の異なる融合タンパク質、または他の関連する治療的物質を発現する細胞であり得る。

40

【0077】

50

用語「持続的」は、本明細書で使用される場合、シグナル伝達の「基底」レベルまたは「抗原非依存性」のシグナル伝達を指し、このようなシグナル伝達としては、免疫細胞（例えば、T細胞）において、その同族のTCRまたは融合タンパク質（例えば、CAR）を介した標的抗原特異的活性化の非存在下で起こる、タンパク質リン酸化、活性化、サイトカイン発現、増殖、またはそれらの組合せなどが挙げられる。

【0078】

融合タンパク質

本明細書で開示される養子免疫療法組成物として使用するための融合タンパク質は、改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む。改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。このような改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質は、野生型CD28共刺激ドメインを含む融合タンパク質と異なる機能的な活性を有する。例えば、本明細書で提供されるCD28共刺激シグナル伝達ドメインへの改変は、融合タンパク質の活性、シグナル伝達の動態、またはシグナル伝達の強度などの機能的な活性を調整し、それによって臨床的な有効性を改善すること、毒性（例えば、被験体に投与される場合、融合タンパク質を発現する宿主細胞の毒性）を低減すること、またはその両方を可能にする。

【0079】

ある特定の態様では、本開示は、標的抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外成分；改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内成分であって、改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、細胞内成分；および細胞外成分と細胞内成分との間に配置された疎水性部分を含む融合タンパク質であって、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質とは異なる機能的な活性を有する、融合タンパク質を提供する。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、宿主細胞によって発現され、機能的な活性は、シグナル伝達の動態（例えば、シグナル伝達のタイミング、順番、配列、または速度）、シグナル伝達の強度、サイトカイン生産、細胞増殖、細胞の存続、抗抗原（例えば、抗腫瘍細胞）活性、持続的なシグナル伝達、免疫抑制成分の遺伝子の発現、またはそれらのあらゆる組合せを含む。

【0080】

本開示の融合結合タンパク質での使用に好適な結合ドメインは、あらゆる抗原結合ポリペプチドであり得る。結合ドメインは、天然抗体、合成もしくは組換え抗体構築物、またはそれらの抗原結合断片を含んでもよい。例えば、結合ドメインは、全長重鎖、Fab断片、Fab'、F(ab')₂、可変重鎖ドメイン（V_Hドメイン）、可変軽鎖ドメイン（V_Lドメイン）、ドメイン抗体（dAb）、単ドメインのラクダ科抗体（VHH）、相補性決定領域（CDR）、または単鎖抗体断片（scFv）を含んでもよく、一部の実施形態では、多重特異性を有していてもよい。結合ドメインの他の例としては、単鎖T細胞受容体（scTCR）、可溶性TCR、可変アルファ鎖ドメイン（V_α）、可変ベータ鎖ドメイン（V_β）、受容体の細胞外結合ドメイン、細胞表面受容体／分子のためのリガンド、腫瘍結合タンパク質／ペプチド、およびサイトカインが挙げられる。ある特定の実施形態では、本開示の融合結合タンパク質の結合ドメインは、CD8の細胞外結合ドメインまたは部分も、機能的なIgV様ドメインを含むそれらのいずれの部分（すなわち、同族のリガンドとの結合が可能なIgV様ドメイン、例えばペプチド：MHC複合体）も含まない。特定の実施形態では、本開示の融合結合タンパク質の結合ドメインは、CD8α鎖由来の結合ドメインも、CD8β鎖由来の結合ドメインも、CD8αホモ二量体由来の結合ドメインも、CD8αβヘテロ二量体由来の結合ドメインも含まない。さらなる実施形態では、本開示の融合結合タンパク質の結合ドメインは、配列番号43に記載のCD8α-IgV様ドメインも、配列番号44に記載のCD8β-IgV様ドメインも含まない。

【0081】

ある特定の実施形態では、結合ドメインは、マウス、ウサギ、ラクダ科、軟骨魚類由来、キメラ、ヒト、またはヒト化である。

【0082】

ある特定の実施形態では、結合ドメインは、抗CD19抗体FMC63または抗ROR1抗体R12由来のscFvを含む。一部の実施形態では、結合ドメインは、配列番号8に記載のFMC63 scFvアミノ酸配列または配列番号9に記載のR12 scFvアミノ酸配列を含む。

【0083】

ROR1に特異的な追加の例示的な結合ドメインとしては、例えば、Yang et al., PLoS One 6:e21018 doi:10.1371, 2011; Paredes-Moscossó et al., Blood 128:2052, 2016; PCT公報第WO2014/031174号、同第WO2016/094873号、および同第WO2017072361号A1; ならびに米国特許/付与前公報第2013/0251642号、同第9,316,646号、同第9,217,040号、同第9,242,014号、同第8,212,009号、同第9,226,952号、同第9,228,023号、および同第9,150,647号に開示された抗体由来のものが挙げられる。これらの抗体およびそれらの結合ドメインは、それらのアミノ酸配列を含めて参照により本明細書に組み込まれる。

【0084】

ある特定の実施形態では、ROR1抗原に結合する結合ドメインは、R12抗体、R11抗体、2A2抗体、R12抗体、UC-961抗体、D10抗体、Y31抗体、またはH10抗体由来である。

【0085】

融合タンパク質の細胞外成分は、必要に応じて、細胞外の非シグナル伝達スパーサーまたはリンカー領域を含んでもよく、これは、例えば、宿主細胞（例えば、T細胞）表面から離れて結合ドメインを位置決めして、適した細胞/細胞の接触、抗原結合および活性化を可能にする（Patel et al., Gene Therapy 6:412-419 (1999)）。融合結合タンパク質の細胞外スパーサー領域は、一般的に、疎水性部分または膜貫通ドメインと細胞外結合ドメインとの間に配置される。スパーサー領域の長さは、選択された標的分子、選択された結合エピトープ、または抗原結合ドメインのサイズおよび親和性に基づき、抗原認識（例えば、腫瘍認識）を最大化するために変更されてもよい（例えば、Guest et al., J. Immunother. 28:203-11 (2005); PCT公報第WO2014/031687号を参照）。ある特定の実施形態では、スパーサー領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域を含む。免疫グロブリンのヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよいし、または変更された野生型免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよい。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンのヒンジ領域は、ヒト免疫グロブリンのヒンジ領域である。免疫グロブリンのヒンジ領域は、IgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMのヒンジ領域であり得る。IgGのヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のヒンジ領域であり得る。例示的な変更されたIgG4のヒンジ領域は、PCT公報第WO2014/031687号に記載されており、そのヒンジ領域は、それらのアミノ酸配列を含めて、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、変更されたIgG4のヒンジ領域は、配列番号12に記載のアミノ酸配列を含む。本明細書に記載される融合結合タンパク質で使用されるヒンジ領域の他の例としては、1型膜タンパク質の細胞外領域、例えばCD8α、CD4、CD28およびCD7中に存在するヒンジ領域が挙げられ、これらは、野生型またはそのバリエーションであってもよい。

【0086】

ある特定の実施形態では、細胞外スパーサー領域は、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはそれらのあらゆる組合せから選択されるFcドメインの全部または一部を含む（例えば、PCT公報第WO2014/031687号

を参照。そのスペーサーは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。Fcドメインまたはその部分は、変更された機能を有する(例えば、抗体のエフェクター機能を低減するように)野生型であり得る。ある特定の実施形態では、細胞外成分は、結合ドメインと疎水性部分との間に配置された、免疫グロブリンのヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはそれらのあらゆる組合せを含む。ある特定の実施形態では、細胞外成分は、IgG1のヒンジ領域、IgG1-CH2ドメイン、およびIgG1-CH3ドメインを含む。さらなる実施形態では、IgG1-CH2ドメインは、(i)N297Q変異、(ii)最初の6アミノ酸(APEFLG)のAPPPVAでの置換、または(i)および(ii)の両方を含む。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンのヒンジ領域、Fcドメインまたはその部分、またはその両方は、ヒトである。

10

【0087】

ある特定の実施形態では、細胞外スペーサー領域は、タグをさらに含む。タグは、養子細胞療法で使用するタグを有する融合タンパク質を発現する細胞がそれを必要とする被験体にうまく移植されるかどうか、またはタグを有する融合タンパク質を発現する細胞が、養子細胞療法を受けている被験体における目的の部位で増殖する、存続する、もしくは局所化するかどうかを決定するのに有用であり得る。タグを有する融合タンパク質を発現する細胞は、タグペプチドに特異的に結合する抗体またはその結合断片を使用して検出することができる。タグはまた、被験体またはその試料から(例えば、全血から、PBMCから、または腫瘍組織もしくは部位から)のタグを有する融合タンパク質を発現する細胞または細胞の集団を濃縮または単離することにも有用であり得る。タグはまた、タグを有する融合タンパク質を発現する細胞または細胞の集団を活性化または拡大増殖させることにも有用であり得る。タグは、酵素、色素、蛍光標識、またはペプチドタグであり得る。例示的なタグペプチドとしては、細菌タンパク質であるストレプトアビジン、およびその誘導体Strept-Tactinと高親和性で結合する、Strept-tag(WRHPQFGG、配列番号39)、Strept-tag-11(WSHPQFEK、配列番号40)、およびStrept-tag-11-9-mer(NWSHPQFEK、配列番号10)が挙げられる。例えば、米国特許第7,981,632号(そこに記載されるStreptタグは、参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。1つまたは複数のタグペプチドを含有するタグを有する融合タンパク質(例えば、キメラ抗原受容体)および検出、単離、濃縮、活性化、または拡大増殖方法は、PCT公報第WO2015/095895号に記載されており、それに記載のタグ、タグを有する融合タンパク質、および方法は、参照により本明細書に組み込まれる。タグの他の例としては、発色性レポーター酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ、シアニン色素、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインまたはそれらのスルホン化誘導体、PE、パシフィックブルー、Alexa fluor、APC、FITC、蛍光タンパク質、Mycタグ、Hisタグ、Flagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Nusタグ、Sタグ、Xタグ、SBPタグ、Softag、V5タグ、CBP、GST、MBP、GFP、チオレドキシントグ、またはそれらのあらゆる組合せを含む酵素が挙げられる。

20

30

【0088】

疎水性部分または膜貫通ドメインは、融合タンパク質の細胞外成分と細胞内成分との間に配置されている。膜貫通ドメインは、宿主細胞膜(例えば、T細胞)を横断し、その中で融合タンパク質を固定する疎水性アルファヘリックスである。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、存在する場合、細胞内成分の由来と同じ分子、例えば、CD28、ITAM含有T細胞活性化ドメイン(例えば、CD3ζ、FcRγ)から選択されるか、または別のI型膜貫通タンパク質、例えばCD4、CD8、CD27から選択される。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞内成分の由来と異なる分子から選択される。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28、CD2、CD3ε、CD3δ、CD3ζ、CD25、CD27、CD40、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95(Fas)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、C

40

50

D150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD200R、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD272 (BTLA)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD300、CD357 (GITR)、A2aR、DAP10、FcRα、FcRβ、FcRγ、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、Slp76、SIRPα、pTα、TCRα、TCRβ、TIM3、TRIM、LPA5、またはZap70の膜貫通ドメインを含む。例示的なCD28膜貫通ドメインは、配列番号13または配列番号41のアミノ酸配列を含む。

【0089】

背景の目的で言えば、T細胞のロバストな活性化は、一般的に、2つの別個のシグナル伝達事象：(1) T細胞活性化を促進する、T細胞受容体(TCR)複合体による抗原の認識を介して提供される抗原特異的シグナル、および(2) 抗原提示細胞上で発現される共刺激分子とT細胞との相互作用またはライゲーションによって提供される非抗原特異的な「共刺激シグナル」を含む。共刺激の非存在下におけるT細胞活性化は、アネルギー、アポトーシス、または免疫寛容を引き起こす可能性がある。共刺激シグナルは、抗原と共にT細胞を刺激し、T細胞の増殖、分化、および存続を促進する。

【0090】

細胞内成分は、融合タンパク質の標的抗原への結合に応答して宿主細胞(例えば、T細胞)の内部にシグナルを導入し、エフェクター機能、例えば、活性化、サイトカイン生産、増殖、分化、存続、細胞傷害性活性、ホーミング、腫瘍の微環境への侵入、またはそれらのあらゆる組合せを惹起する融合結合タンパク質の一部を指す。

【0091】

本開示の融合タンパク質の細胞内成分は、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む。CD28は、ナイーブT細胞のための主要な共刺激受容体であり、T細胞応答の開始に関与する。CD28は、主として抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞)上で発現されるCD80およびCD86に結合する。CD28のそのリガンドとの結合は、T細胞受容体シグナル伝達と共に、抗原で刺激されたT細胞の拡大増殖およびエフェクターおよびメモリー細胞への分化を促進する。CD28シグナル伝達は、サイトカイン生産(例えば、IL-2)を強化し、細胞生存遺伝子(例えば、Bcl-2)を上方調節し、エネルギー代謝を促進し、細胞周期の進行を容易にする。CD28共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28の全長細胞内ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインのランケートされた部分を指す場合もあり、ただし、ランケートされた部分は、シグナル伝達活性(例えば、野生型CD28の、少なくとも約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または野生型CD28に実質的に類似した活性)を保持する。例示的な野生型、全長ヒトCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、改変された機能的なCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質は、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質と異なる機能的な活性を有すると予想される。ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、または少なくとも約15個のアミノ酸置換を含み、ただし、改変されたCD28共刺激ドメインは、T細胞活性化を促進するのに十分なシグナル伝達活性を保持する(すなわちこれは、機能的なバリエーションである)。ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも約15、約16、約17、約18、約19、約20、約25、または約30個のアミノ酸置換を含み、ただし、改変されたCD28共刺激ドメインは、T細胞活性化を促

10

20

30

40

50

進するのに十分なシグナル伝達活性を保持する（すなわちこれは、機能的なバリエーションである）。融合タンパク質の機能性を測定するための例示的なアッセイとしては、サイトカイン生産（例えば、サイトカインELISA）、T細胞増殖（例えば、FACSによって）、殺腫瘍細胞活性（例えば、*in vitro* 標識クロム放出アッセイ（CRA）を使用する、または*in vivo*における腫瘍サイズのイメージングによる）、共刺激マーカーのT細胞表面発現、および抗原刺激に応答するT細胞消耗マーカーの非存在（または存在）（例えば、検出可能に標識された抗体を使用することによる）を測定するためのアッセイが挙げられる。

【0092】

ある特定の実施形態では、CD28共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸は、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインにおいてその位置に天然に存在するアミノ酸以外のあらゆるアミノ酸で置換される。ある特定の実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸で置換される。

【0093】

「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似の特性を有する別のアミノ酸（例えば、別の天然に存在する、もしくは合成的に生産されたアミノ酸、またはそれらの模倣物）での置換として当技術分野において認められている。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。例示的な保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換を含む。類似のアミノ酸は、以下のカテゴリーに含まれ得る：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）；酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）；非荷電性の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、ヒスチジン）；非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）；ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）。プロリンは、分類がより難しいとみなされており、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（例えば、ロイシン、バリン、イソロイシン、およびアラニン）と特性を共有する。ある特定の環境において、グルタミン酸のグルタミンでの置換またはアスパラギン酸のアスパラギンでの置換は、グルタミンおよびアスパラギンはそれぞれグルタミン酸およびアスパラギン酸のアミド誘導体であるという点で、類似の置換とみなすことができる。さらなる例示的な保存的置換は当技術分野において周知であり（例えば、PCT公報第WO97/09433号、10頁；Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition；Worth Publishers, Inc. NY, NY, pp. 71-77, 1975；Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990を参照）、これらに記載の保存的置換は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0094】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質中に全長CD28分子が存在しない場合もあるが、参照の目的で、アミノ酸置換は、全長CD28ポリペプチド内のアミノ酸残基の位置を指す場合もある。具体的な実施形態では、アミノ酸置換は、UniProt: P10747（配列番号1）に記載の全長ヒトCD28ポリペプチド内のアミノ酸残基の位置を指す。

【0095】

ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、その場合、少なくとも1つの（すなわち、1つまたは複数の）チロシン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されているか、少なくとも1つのプロリン残基が、異なるアミノ酸残基で置換されているか、またはその両方である。一部の実施形態では、少なくとも1、2、3、または4つのチロシン残基が置換されている。2つ

またはそれより多くのチロシン置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインの場合、各チロシン置換は、同一でもよいし、または異なってもよい。さらなる実施形態では、少なくとも1つのチロシン残基は、保存的アミノ酸で置換されている。具体的な実施形態では、少なくとも1つのチロシン残基は、フェニルアラニン残基で置換されている。別の具体的な実施形態では、少なくとも1つのチロシン残基は、トリプトファン残基で置換されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのチロシン残基が、トリプトファン残基で置換されており、少なくとも1つのチロシン残基が、フェニルアラニン残基で置換されている。

【0096】

一部の実施形態では、少なくとも1、2、3、または4つのプロリン残基が置換されている。2つまたはそれより多くのプロリン置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインの場合、各プロリン置換は、同一でもよいし、または異なってもよい。さらなる実施形態では、少なくとも1つのプロリン残基は、保存的アミノ酸で置換されている。具体的な実施形態では、少なくとも1つのプロリン残基は、アラニン残基で置換されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロリン残基は、アラニン残基で置換されており、少なくとも1つのプロリン残基は、異なる（アラニンではない）アミノ酸で置換されている。

【0097】

ある特定の実施形態では、置換のための少なくとも1つのチロシン残基は、191、206、209、および218位のいずれか1つから選択される（位置は、配列番号1に記載の全長の野生型ヒトCD28を参照する）。一部の実施形態では、191、206、209、および218位のいずれか1つから選択される少なくとも2、3、または4つのチロシン残基が置換されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのチロシン残基は、保存的アミノ酸、例えばフェニルアラニンで置換されている。

【0098】

ある特定の実施形態では、置換のための少なくとも1つのプロリン残基は、196、199、208、および211位のいずれか1つから選択される（位置は、配列番号1に記載の全長の野生型ヒトCD28を参照する）。一部の実施形態では、196、199、208、および211位のいずれかから選択される少なくとも2、3、または4つのプロリン残基が置換されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロリン残基は、保存的アミノ酸、例えばアラニンで置換されている。

【0099】

一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、Y191、Y206、Y209、Y218、Y191/Y206、Y191/Y209、Y191/Y218、Y206/Y209、Y206/Y218、Y209/Y218、Y191/Y206/Y209、Y191/Y206/Y218、Y191/Y209/Y218、Y206/Y209/Y218、またはY191/Y206/Y209/Y218置換を含む。

【0100】

一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、P196、P199、P208、P211、P196/P199、P196/P208、P196/P211、P199/P208、P199/P211、P208/P211、P196/P199/P208、P196/P199/P211、P196/P208/P211、P199/P208/P211、またはP196/P199/P208/P211置換を含む。

【0101】

一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激ドメインは、Y191、Y206、Y209、Y218、Y191/Y206、Y191/Y209、Y191/Y218、Y206/Y209、Y206/Y218、Y209/Y218、Y191/Y206/Y209、Y191/Y206/Y218、Y191/Y209/Y218、Y206/Y

209/Y218、またはY191/Y206/Y209/Y218のいずれか1つから選択される少なくとも1つのチロシン置換；およびP196、P199、P208、P211、P196/P199、P196/P208、P196/P211、P199/P208、P199/P211、P208/P211、P196/P199/P208、P196/P199/P211、P196/P208/P211、P199/P208/P211、またはP196/P199/P208/P211のいずれか1つから選択される少なくとも1つのプロリン置換を含む。

【0102】

さらなる実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、Y191F、Y206F、Y209F、Y218F、Y191F/Y206F、Y191F/Y209F、Y191F/Y218F、Y206F/Y209F、Y206F/Y218F、Y209F/Y218F、Y191F/Y206F/Y209F、Y191F/Y206F/Y218F、Y191F/Y209F/Y218F、Y206F/Y209F/Y218F、またはY191F/Y206F/Y209F/Y218F置換を含む。

【0103】

一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、P196A、P199A、P208A、P211A、P196A/P199A、P196A/P208A、P196A/P211A、P199A/P208A、P199A/P211A、P208A/P211A、P196A/P199A/P208A、P196A/P199A/P211A、P196A/P208A/P211A、P199A/P208A/P211A、またはP196A/P199A/P208A/P211A置換を含む。

【0104】

一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激ドメインは、Y191F、Y206F、Y209F、Y218F、Y191F/Y206F、Y191F/Y209F、Y191F/Y218F、Y206F/Y209F、Y206F/Y218F、Y209F/Y218F、Y191F/Y206F/Y209F、Y191F/Y206F/Y218F、Y191F/Y209F/Y218F、Y206F/Y209F/Y218F、またはY191F/Y206F/Y209F/Y218Fのいずれか1つから選択される少なくとも1つのチロシン置換；およびP196A、P199A、P208A、P211A、P196A/P199A、P196A/P208A、P196A/P211A、P199A/P208A、P199A/P211A、P208A/P211A、P196A/P199A/P208A、P196A/P199A/P211A、P196A/P208A/P211A、P199A/P208A/P211A、またはP196A/P199A/P208A/P211Aのいずれか1つから選択される少なくとも1つのプロリン置換を含む。

【0105】

本明細書に記載される改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインのいずれかにおいて、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、L186位およびL187位のそれぞれにおける置換をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、改変されたCD28共刺激ドメインは、L186G/L187G置換を含む。186位および187位における2つのロイシンの2つのグリシンへの置換は、宿主免疫細胞において融合タンパク質発現を増加させることが示されている(Nguyen et al., Blood 102:4320-4325 (2003))を参照、これらに記載の置換変異は、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0106】

ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、Y191、P208、P211、またはそれらのあらゆる組合せにおける置換を含まない。

【0107】

改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインの例示的なアミノ酸配列は、配列番号4～6および45～47で提供される。

【0108】

本開示に記載される改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質は、「野生型」CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む融合タンパク質と比較した場合、前記融合タンパク質を発現する免疫細胞においてモジュレートされた機能的な活性を呈示する。融合タンパク質を発現する免疫細胞の機能的な活性のモジュレーションとしては、シグナル伝達の動態（例えば、シグナル伝達のタイミング、順番、配列、または速度）のモジュレーション、シグナル伝達の強度、サイトカイン生産、細胞増殖、細胞の存続、抗腫瘍活性、持続的なシグナル伝達、免疫抑制成分の遺伝子の発現、またはそれらのあらゆる組合せを挙げることができる。ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、融合タンパク質を発現する免疫細胞におけるサイトカイン生産を低減する。発現が低減され得るサイトカインの例としては、IL-2およびTNF- α が挙げられる。サイトカインレベルを測定する方法は当技術分野において公知であり、その例としては、ELISA、ウェスタンブロット、抗体アレイ、フローサイトメトリー、および血球計算ビーズアレイによる定量化が挙げられる。

10

【0109】

ある特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、融合タンパク質を発現する免疫細胞において持続的なシグナル伝達を低減する。持続的なシグナル伝達は、持続的なタンパク質リン酸化、活性化、サイトカイン発現、増殖、またはそれらの組合せを含んでもよい。具体的な実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインは、前記融合タンパク質を発現するT細胞において、CD3 ζ 、例えばY142位におけるCD3 ζ の持続的なリン酸化を低減する。

20

【0110】

細胞内成分は、必要に応じて、受容体由来の細胞内活性化ドメイン、例えばITAM含有T細胞活性化ドメインをさらに含む。本開示の融合タンパク質で使用されるITAM含有T細胞活性化モチーフは、少なくとも1つのITAMを含有する免疫細胞受容体または細胞表面マーカーの、細胞内シグナル伝達ドメインまたはその部分と同一であってもよいし、またはそれらの機能的なバリエーションであってもよい。一般的に、ITAM含有T細胞活性化ドメインは、融合タンパク質の結合ドメインがその標的抗原と係合するとき、T細胞活性化シグナルを提供する。本明細書に記載される融合タンパク質において使用できるITAM含有細胞内活性化ドメインの非限定的な例としては、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、FcR γ 、CD3 δ 、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66d、Fc ϵ R IまたはFc γ R I、FcR γ 2a、FcR γ 2b1、FcR γ 2a1、FcR γ 2b2、FcR γ 3a、FcR γ 3b、FcR β 1、Fc ϵ Rのガンマ鎖）、ナチュラルキラー細胞受容体タンパク質（例えば、DAP12）、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD89、ならびにCD278上に存在するものが挙げられる。特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質の細胞内シグナル伝達成分は、CD3 ζ ITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。例示的なCD3 ζ ITAM含有T細胞活性化ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質の細胞内成分は、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインおよびCD3 ζ ITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。

30

40

【0111】

細胞内成分は、必要に応じて、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン以外の追加の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。追加の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28以外の共刺激分子の全長細胞内ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインのトランケートされた部分を含んでもよく、ただしトランケートされた部分は、十分なシグナル伝達活性を保持する。ある特定の実施形態では、追加の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27、CD40L、GITR、NKG2C、CARD1、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX-40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA4）、C

50

D 2 2 3 (L A G 3)、C D 2 7 0 (H V E M)、C D 2 7 3 (P D - L 2)、C D 2 7 4 (P D - L 1)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C S L P 7 6、T R I M、Z A P 7 0、C D 5、B A F F - R、S L A M F 7、N K p 8 0、C D 1 6 0、B 7 - H 3、C D 8 3と特異的に結合するリガンド、またはそれらの組合せから選択される。ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質の細胞内成分は、改変されたC D 2 8共刺激シグナル伝達ドメイン、C D 3 ζ I T A M含有T細胞活性化ドメイン、およびC D 2 7、C D 4 0 L、G I T R、N K G 2 C、C A R D 1、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 3 0、C D 4 0、C D 5 4 (I C A M)、C D 8 3、C D 1 3 4 (O X - 4 0)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 1 5 0 (S L A M F 1)、C D 1 5 2 (C T L A 4)、C D 2 2 3 (L A G 3)、C D 2 7 0 (H V E M)、C D 2 7 3 (P D - L 2)、C D 2 7 4 (P D - L 1)、C D 2 7 8 (I C O S)、D A P 1 0、L A T、N K D 2 C S L P 7 6、T R I M、Z A P 7 0、C D 5、B A F F - R、S L A M F 7、N K p 8 0、C D 1 6 0、B 7 - H 3、C D 8 3と特異的に結合するリガンド、またはそれらの組合せから選択される追加の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。具体的な実施形態では、改変されたC D 2 8共刺激シグナル伝達ドメイン、C D 3 ζ I T A M含有T細胞活性化ドメイン、および4 - 1 B B共刺激シグナル伝達ドメインを含む。例示的な4 - 1 B B共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む。

【0112】

本開示の融合タンパク質は、キメラ抗原受容体 (C A R)、キメラ共刺激受容体 (C C R)、スプリット-C A RまたはオンスイッチC A R、細胞内シグナル伝達ドメインに連結された単鎖T細胞受容体 (s c T C Rまたはs c T v)、またはT C R - C A Rの形態であってもよい。一部の実施形態では、C A Rは、一般的に、活性化シグナルを提供する単一の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、C D 3 ζまたはF c γ R Iの細胞内シグナル伝達ドメインまたは他のI T A M含有T細胞活性化ドメイン) を有する。一部の実施形態では、C A Rはさらに、細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン (例えば、内因性T細胞の共刺激受容体、例えばC D 2 8、4 - 1 B B、またはI C O S由来の共刺激シグナル伝達ドメイン) を含む。一部の実施形態では、C A Rはさらに、第2の共刺激ドメインを含む。C C Rは、設計がC A Rと類似しており、共刺激シグナル伝達ドメインを介して共刺激を提供するが、I T A M含有T細胞活性化ドメインを含まない。C C Rは、適切なヘテロ二量体化剤 (例えば、スプリット-C A RまたはオンスイッチC A R設計) が投与されたときの集合のための細胞内活性化ドメインおよび対応するヘテロ二量体化ドメインを含むポリペプチドと宿主細胞中で共発現させるためのヘテロ二量体化ドメインをさらに含むいてもよい。T C R - C A Rは、一般的に可溶性T C R ($V_{\alpha} C_{\alpha}$ ポリペプチド鎖および $V_{\beta} C_{\beta}$ ポリペプチド鎖) を含むヘテロ二量体の融合タンパク質であり、 $V_{\beta} C_{\beta}$ ポリペプチド鎖は、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達成分に連結されている (例えば、I T A M含有T細胞活性化ドメインおよび必要に応じて共刺激シグナル伝達ドメインを含む)。s c T C R融合タンパク質は、s c T C Rを含む結合ドメイン (V_{β} に連結されたT C R V_{α})、必要に応じた細胞外スペーサー、膜貫通ドメイン、ならびにT細胞活性化シグナルを提供する単一の細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、C D 3 ζ I T A M含有T細胞活性化ドメイン) および必要に応じて共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内成分を含む (A g g e n e t a l., Gene Ther. 19:365-374 (2012); Stone et al., Cancer Immunol. Immunother. 63:1163-76 (2014)を参照)。

【0113】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される融合タンパク質は、病原体由来の抗原、自己免疫疾患関連の抗原、がん抗原、または自己抗原を標的化する結合ドメインを含む。病原体関連または病原体特異的抗原の例としては、ウイルス抗原 (例えば、H I V抗原、H C V抗原、H B V抗原、C M V抗原、H P V抗原、E B V抗原、インフルエンザ抗原、呼吸器合胞体ウイルス抗原)、寄生生物抗原、および細菌抗原が挙げられる。がん抗原は、それに対してがん細胞または腫瘍の殺滅を引き起こす細胞媒介性免疫応答を誘発させ

ることが望ましいと予想される臨床的な利益を有するあらゆる抗原であり得る。融合タンパク質によって標的化され得るがん抗原の非限定的な例としては、BCMA、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-アセチルGD2、O-アセチルGD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFB2、TGFB1、IL6R、gp130、ルイスA、ルイスY、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A（例えば、MAGE-A1、MAGE-A3、およびMAGE-A4を含む）、メソテリン、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、HLAに結合した腫瘍または病原体関連のペプチド、HLAに結合したhTERTペプチド、HLAに結合したチロシナーゼペプチド、HLAに結合したWT-1ペプチド、LTβR、LIFRβ、LRP5、MUC1、OSMRβ、TCRα、TCRβ、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、HA¹-H、Robo1、α-フェトプロテイン（AFP）、Frizzled、OX40、PRAME、およびSSX-2が挙げられる。

10

【0114】

本明細書で提供される実施形態のいずれかでは、融合タンパク質は、「ユニバーサルキメラ抗原受容体」であり得る。ユニバーサルCARは、疾患関連抗原ではなくタグに結合する結合ドメインを含む。ユニバーサルCARを含む改変された免疫細胞は、疾患関連抗原に結合するタグを有するタンパク質（例えば、疾患関連抗原に結合するタグを有する抗体）を投与することによって、疾患関連抗原に再び方向付けることができる。タグは、タンパク質、ペプチド、小分子、またはハプテンであり得る。例示的なタグとしては、ホルモン由来のペプチド、リガンド由来のペプチド、サイトカイン由来のペプチド、ケモカイン由来のペプチド、増殖因子由来のペプチド、細胞接着分子由来のペプチド、シグナル伝達ペプチド、受容体由来のペプチド、細胞表面ペプチド、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ジニトロフェノール、ペリジニクロロフィルタンパク質複合体、緑色蛍光タンパク質、ビオチン、フィコエリトリン（PE）、ヒスチジン、ストレプトアビジン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、パルミトイル化、ニトロシル化、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、DOTA、ジニトロフェノール、キノン、ビオチン、アニリン、アトラジン、アニリン誘導体、o-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、ヒドララジン、ハロタン、ジゴキシゲニン、ベンゼンアルソネート、ラクトース、トリニトロフェノール、ハプテン、ステロイド、ビタミン、ビタマー、代謝産物、抗生物質、単糖、二糖、脂質、脂肪酸、核酸、アルカロイド、配糖体、フェナジン（phenazine）、ポリケチド、テルペン、テトラピロール、およびヒト核タンパク質由来のペプチド（例えば、ヒト核Laタンパク質（E5B9））が挙げられる。ユニバーサルCARならびにその作製および使用方法は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第9,233,125号；PCT公報第WO2013/044225号；PCT公報第WO2016/168766号；PCT公報第WO2016/168773号；および米国特許公開第2017/0240612号に記載されており、それらそれぞれに記載のCARおよび関連方法は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

40

【0115】

一部の実施形態では、本開示のCARは、CD19またはROR1に特異的な結合ドメインを含む細胞外成分；必要に応じてタグ（すなわち、融合タンパク質がユニバーサルCARである場合、ユニバーサルCARと結合するタグと異なるタグ）；免疫グロブリンのヒンジ領域；疎水性部分；ならびにITAM含有T細胞活性化ドメインおよび改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインまたはそれらの機能的部分を含む細胞内成分を含み

50

、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分は、L186、L187、Y191、Y206、Y209、Y218、P196、P199、P208、およびP211位の1つまたは複数に本明細書で開示された置換を含む。特定の実施形態では、改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分は、以下の位置：(a) L186、L187、およびY218；(b) L186、L187、Y206、Y209、およびY218；(c) L186、L187、Y191、Y206、Y209、およびY218；(d) L186G、L187G、およびY218F；(e) L186G、L187G、Y206F、Y209F、およびY218F；または(f) L186G、L187G、Y191F、Y206F、Y209F、およびY218Fに置換を含む。上述の実施形態のいずれかでは、タグは、Streptag IIを含む。

10

【0116】

ある特定の実施形態では、本開示のCARは、FMC63（抗CD19）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号27（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号27のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号27のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

20

【0117】

さらなる実施形態では、本開示のCARは、FMC63（抗CD19）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、Y206F、Y209F、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号29（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号29のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号29のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

30

【0118】

よりさらなる実施形態では、本開示のCARは、FMC63（抗CD19）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、Y191F、Y206F、Y209F、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号35（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号35のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号35のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

40

【0119】

よりさらなる実施形態では、本開示のCARは、R12（抗ROR1）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号31（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号3

50

1のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号31のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

【0120】

さらなる実施形態では、本開示のCARは、R12（抗ROR1）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、Y206F、Y209F、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号33（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号33のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号33のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

10

【0121】

よりさらなる実施形態では、本開示のCARは、R12（抗ROR1）scFv、Streptag IIペプチド、変更されたIgG4のヒンジ領域を含む細胞外成分；CD28膜貫通ドメインを含む疎水性部分；L186G、L187G、Y191F、Y206F、Y209F、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むITAM含有T細胞活性化ドメインを含む。このようなCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号37（アミノ酸1～22にシグナルペプチドを含む）またはアミノ酸1～22を含まない配列番号37のアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号37のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

20

【0122】

一部の実施形態では、本開示のCARは、配列番号64～69のいずれか1つのアミノ酸配列（配列番号64～69それぞれのアミノ酸1～22にシグナルペプチドを含むかまたは含まない）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0123】

一部の実施形態では、本開示のCAR（例えば、CAR発現構築物によってコードされたポリペプチド）は、配列番号49、51、53、55、57、または59のいずれか1つのアミノ酸配列（配列番号49、51、53、55、57、または59それぞれのアミノ酸1～22にシグナルペプチドを含むかまたは含まない）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。さらなる実施形態では、CARは、配列番号49、51、53、55、57、または59のT2AおよびtEGFRのアミノ酸配列を欠如していてもよい。

30

【0124】

ポリヌクレオチド、ベクター、および宿主細胞

40

ある特定の態様では、本明細書に記載されるいずれか1つまたは複数の融合タンパク質をコードする核酸分子が提供される。所望の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、Sambrook et al. (1989 and 2001 editions; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) および Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 2003) に記載されたような、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、およびDNAシーケンシングの使用を含むあらゆる好適な分子生物学の操作技術を使用することによって達成することができる。代替として、目的の配列は、合成的に生産することができる。

50

効率的な転写および翻訳を達成するために、各組換え発現構築物中のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの適切な発現制御配列（調節配列とも称される）、例えばリーダー配列、および特に免疫原をコードするヌクレオチド配列に動作可能に（すなわち、作動可能に）連結されたプロモーターを含む。

【0125】

本開示の核酸は、あらゆる形態の一本鎖または二本鎖DNA、cDNAまたはRNAを指すことができ、アンチセンスDNA、cDNAおよびRNAなどの、互いに相補的な核酸のプラス鎖およびマイナス鎖を含み得る。またsiRNA、マイクロRNA、RNA-DNAハイブリッド、リボザイム、および他の様々なDNAまたはRNAの天然に存在する、または合成の形態も含まれる。

10

【0126】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、本開示のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞における効率的な発現のためにコドン最適化されていてもよい（例えば、Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135-145 (2006)を参照）。「コドン最適化された」ポリヌクレオチドは、本明細書で使用される場合、目的の宿主細胞における多量のtRNAレベルに対応するサイレント変異で改変されたコドンを有する異種ポリヌクレオチドを含む。

【0127】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、48、50、52、54、56、または58のいずれか1つに記載の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するポリヌクレオチドを含み、必要に応じて、配列番号18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、48、50、52、54、56、または58のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含んでいてもよいし、またはそれからなってもよい。

20

【0128】

単一のポリヌクレオチド分子は、本明細書で開示された実施形態のいずれかに従って1、2種、またはそれより多くの融合タンパク質をコードしていてもよい。1つより多くの転写物をコードするポリヌクレオチドは、多シストロン性発現のための各転写物間に配置された配列（例えば、ウイルス2Aペプチドをコードする配列）を含んでいてもよい。

30

【0129】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ベクターの1つまたは複数のある特定のエレメントに作動可能に連結されていてもよい。例えば、それらがライゲーションしているコード配列の発現およびプロセッシングを実行するのに必要なポリヌクレオチド配列が、作動可能に連結されていてもよい。発現制御配列としては、適切な転写開始、終結、プロモーター、およびエンハンサー配列；効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えばスプライシングおよびポリアダニル化シグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を強化する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を強化する配列；および場合によってタンパク質の分泌を強化する配列を挙げることができる。発現制御配列は、目的の遺伝子と連続している場合、それと作動可能に連結されていてもよく、発現制御配列は、トランスで、または目的の遺伝子を制御するような距離で作用する。

40

【0130】

ある特定の実施形態は、ベクター中に含有される本開示のポリヌクレオチドを含む。例示的なベクターは、それに連結された別の核酸分子を輸送することが可能な核酸分子、または宿主生物中での複製が可能な核酸分子を含んでいてもよい。ベクターの一部の例としては、プラスミド、ウイルスベクター、コスミドなどが挙げられる。一部のベクターは、それらが導入される宿主細胞中での自律複製が可能なものであってもよいし（例えば細菌

50

の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)、それに対して他のベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれるものでもよいし、または宿主細胞に導入されるときにポリヌクレオチド挿入物の組み込みを促進し、それによって宿主ゲノムと共に複製するものでもよい(例えば、レンチウイルスベクター)。加えて、一部のベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を指示することが可能である(これらのベクターは、「発現ベクター」と称することもできる)。関連の実施形態によれば、1つまたは複数の作用物質(例えば、本明細書に記載される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)が被験体に共投与される場合、そのそれぞれの作用物質は、別個の、または同じベクターに存在していてもよく、複数のベクター(それぞれ異なる作用物質または同じ作用物質を含有する)が細胞または細胞集団に導入されてもよいし、または被験体に投与されてもよいことがさらに理解される。

【0131】

ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、RNAベクター、または染色体、非染色体、半合成もしくは合成の核酸分子を含み得る直鎖もしくは環状のDNAもしくはRNA分子であってもよい。例示的なベクターは、それが連結されている核酸分子の自律複製(エピソードベクター)または発現(発現ベクター)が可能なものである。

【0132】

ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス(例えば、アデノ随伴ウイルス)、コロナウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、例えばオルトミクソウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)、ラブドウイルス(例えば、狂犬病および水疱性口内炎ウイルス)、パラミクソウイルス(例えば、麻疹およびセンダイ)、プラス鎖RNAウイルス、例えばピコルナウイルスおよびアルファウイルス、ならびに二本鎖DNAウイルス、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純疱疹ウイルス1型および2型、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス)、およびポックスウイルス(例えば、ワクシニア、鶏痘およびカナリア痘瘡)が挙げられる。他のウイルスとしては、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが挙げられる。レトロウイルスの例としては、トリ白血病肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが挙げられる(Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology, Third Edition*, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

【0133】

ウイルスベクターは、ある特定の実施形態では、ガンマレトロウイルス、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス(MLV)由来のベクターであってもよい。他の実施形態では、ウイルスベクターは、より複雑なレトロウイルス由来のベクター、例えば、レンチウイルス由来のベクターであってもよい。HIV-1由来のベクターは、このカテゴリーに属する。他の例としては、HIV-2、FIV、ウマ伝染性貧血ウイルス、SIV、およびマエディビスナウイルス(ヒツジレンチウイルス)由来のレンチウイルスベクターが挙げられる。哺乳動物宿主細胞をCAR導入遺伝子を含むウイルス粒子で形質導入するためのレトロウイルスおよびレンチウイルスのウイルスベクターならびにパッケージング細胞の使用方法は当技術分野において公知であり、これまでに、例えば、米国特許第8,119,772号;Walchli et al., *PLoS One* 6:327930 (2011);Zhao et al., *J. Immunol.* 174:4415 (2005);Engels et al., *Hum. Gene Ther.* 14:1155 (2003);Frecha et al., *Mol. Ther.* 18:1748 (2010);およびVerhoeven et al., *Methods Mol. Biol.* 506:97 (2009)で記載されている。レ

トロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物および発現系も商業的に入手可能である。DNAウイルスベクター、例えばアデノウイルスベースのベクターおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベースのベクターなど；単純疱疹ウイルス (HSV) 由来のベクター、例えばアンプリコンベクター、複製欠損HSVおよび弱毒化HSVなどを含む他のウイルスベクターも、ポリヌクレオチド送達のために使用することができる (Kriskey et al., Gene Ther. 5:1517 (1998))。

【0134】

遺伝子治療での使用のために開発された他のベクターも、本開示の組成物および方法と共に使用することができる。このようなベクターとしては、バキュロウイルスおよびα-ウイルス由来のもの (Jolly, D. J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp. 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab)、またはプラスミドベクター (例えばスリーピングビューティーまたは他のトランスポゾンベクター) が挙げられる。

【0135】

効率的な転写および翻訳を達成するために、各組換え発現構築物中のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの適切な発現制御配列 (調節配列とも称される)、例えばリーダー配列、および特に免疫原をコードするヌクレオチド配列に動作可能に (すなわち、作動可能に) 連結されたプロモーターを含む。

【0136】

マーカーは、異種ポリヌクレオチドの発現を、それで形質導入された宿主細胞によって同定またはモニターするのに、または目的の融合タンパク質を発現する細胞を検出するのに使用されることがある。ある特定の実施形態では、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、マーカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。マーカーは、薬物耐性を付与する選択マーカー、または検出可能なマーカー、例えばフローサイトメトリーなどの方法によって検出できる蛍光マーカーまたは細胞表面タンパク質であり得る。ある特定の実施形態では、マーカーをコードするポリヌクレオチドは、免疫グロブリン結合タンパク質または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの3'に配置される。他の実施形態では、マーカーをコードするポリヌクレオチドは、免疫グロブリン結合タンパク質または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの5'に配置される。例示的なマーカーとしては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ヒトCD2の細胞外ドメイン、トランケート型ヒトEGFR (huEGFRt; Wang et al., Blood 118:1255 (2011) を参照されたい)、トランケート型ヒトCD19 (huCD19t)、トランケート型ヒトCD34 (huCD34t)；またはトランケート型ヒトNGFR (huNGFRt) が挙げられる。ある特定の実施形態では、コードされたマーカーは、EGFRt、CD19t、CD34t、またはNGFRtを含む。例示的なトランケート型ヒトEGFR配列は、配列番号17のアミノ酸配列を含む。

【0137】

ある特定の実施形態では、ベクターは、自殺遺伝子をさらに含んでもよく、自殺遺伝子の発現は、ベクターを含む宿主細胞の死を引き起こす。例えば、一部の案件において、本発明の融合タンパク質の長期の発現は、望ましくない。ベクター中の自殺遺伝子の包含は、被験体における融合タンパク質発現のより精密な制御を可能にする。ある特定の実施形態では、例えば、自殺遺伝子の発現を調節する誘導性プロモーターを使用する場合、自殺遺伝子の発現は誘導性である。具体的な実施形態では、自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ9遺伝子である (米国付与前特許公報第2013/0071414号を参照、そこに記載の自殺遺伝子は、参照により本明細書に組み込まれる)。他の自殺遺伝子としては、医薬品グレードの抗EGFRモノクローナル抗体のためのコンフォメーション的に無傷の結合エピトープ、セツキシマブ (アービタックス)；EGFRt、カスパーゼポリペプチド (例えば、iCasp9; Straathof et al., Blood 10

5:4247-4254, 2005; Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011; Zhou and Brenner, Exp. Hematol. pii: S0301-472X(16)30513-6. doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011)、RQR8 (Philip et al., Blood 124:1277-1287, 2014)、本明細書で論じられるようなヒトc-mycタンパク質(Myc)の10アミノ酸のタグ(Kieback et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:623-628, 2008)、およびマーカ―/セーフティースイッチポリペプチド、例えばRQR(CD20+CD34; Philip et al., 2014)のいずれか1つまたは複数をコードする遺伝子が挙げられる。

10

【0138】

ウイルスベクターゲノムが、宿主細胞中で別個の転写物として発現させようとする複数のポリヌクレオチドを含む場合、ウイルスベクターはまた、バイシストロン性または多シストロン性発現を可能にする2つの(またはそれより多くの)転写物間に追加の配列を含んでいてもよい。ウイルスベクターで使用されるこのような配列の例としては、内部リボソーム進入部位(IRES)、フューリン切断部位、ウイルス2Aペプチド、またはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

【0139】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、ポリヌクレオチドは、自己切断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、自己切断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、マーカ―をコードするポリヌクレオチドとの間に配置される。ある特定の実施形態では、自己切断ポリペプチドは、ブタテッシュウウイルス-1(P2A)、Thosea asi gn a ウイルス(T2A)、ウマ鼻炎Aウイルス(E2A)、口蹄疫ウイルス(F2A)、またはそれらのバリエーション由来の2Aペプチドを含む。ある特定の実施形態では、例示的なT2Aペプチド配列は、配列番号16のアミノ酸配列を含む。2Aペプチドのさらなる例示的な核酸およびアミノ酸配列は、例えば、Kim et al. (PLOS One 6:e18556 (2011)、そこに記載の2A核酸およびアミノ酸配列は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

20

30

【0140】

本開示の融合タンパク質は、ある特定の態様では、宿主細胞の表面上で発現させてもよいし、または宿主細胞によって分泌させてもよいし、または宿主細胞から単離してもよい。宿主細胞としては、ベクターの受け入れまたは核酸の取込みまたはタンパク質の発現が可能ならぬあらゆる個々の細胞または細胞培養物を挙げることができる。この用語はまた、遺伝学的または表現型的に同一かまたは異なるかどうかにかかわらず、宿主細胞の後代も包含する。好適な宿主細胞は、ベクターによって決めることができ、その例としては、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を挙げることができる。これらの細胞は、ウイルスベクター、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-セキストラン、電気穿孔、マイクロインジェクション、または他の方法を介した形質転換の使用によってベクターまたは他の物質を取り込むように誘導されてもよい。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)を参照されたい。

40

【0141】

ベクターに加えて、ある特定の実施形態は、本開示に従って、融合タンパク質(例えば、CAR)をコードする異種ポリヌクレオチド、または融合タンパク質(例えば、CAR)をコードする異種ポリヌクレオチドを含むベクターを含有するように改変された(すなわち、遺伝子操作された)宿主細胞に関する。少なくとも1つの融合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む、改変されたまたは遺伝子操作された宿主細胞は、その

50

細胞表面で、少なくとも1つの本開示の融合タンパク質を発現する。改変された宿主細胞は、本開示の、単一のタイプの融合タンパク質、または2つまたはそれより多くの異なるタイプの融合タンパク質を発現することができる。宿主細胞は、*ex vivo*または*in vivo*で改変されていてもよい。宿主細胞としては、ベクターの受け入れまたは核酸もしくはタンパク質の取込みが可能なあらゆる個々の細胞または細胞培養物、加えてあらゆる後代細胞を挙げることができる。この用語はまた、遺伝学的または表現型的に同一かまたは異なるかどうかにかかわらず、宿主細胞の後代も包含する。好適な宿主細胞は、ベクターによって決めることができ、その例としては、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を挙げることができる。これらの細胞は、ウイルスベクター、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン、電気穿孔、マイクロインジェクション、または他の方法を介した形質転換の使用によってベクターまたは他の物質を取り込むように誘導されてもよい。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)を参照されたい。上述の実施形態のいずれかでは、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞は、例えば養子免疫療法の手順において、改変された宿主細胞を受ける被験体にとって自己、同種または同系である細胞で構成される。

10

【0142】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質を発現するように形質導入された宿主細胞は、造血前駆細胞またはヒト免疫系細胞である。「造血前駆細胞」は、本明細書で使用される場合、造血幹細胞または胎児組織から誘導でき、成熟細胞型（例えば、免疫系細胞）へのさらなる分化が可能な細胞である。例示的な造血前駆細胞としては、 $CD24^L \circ Lin^- CD117^+$ 表現型を有するもの、または胸腺で見出されるもの（胸腺前駆細胞と称される）が挙げられる。

20

【0143】

ある特定の実施形態では、宿主細胞は、免疫系細胞であり、例えば、B細胞、T細胞（例えば、 $CD4^+ T$ 細胞、 $CD8^+ T$ 細胞、 $CD4^- CD8^-$ 二重陰性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、調節性T細胞）、ナチュラルキラー細胞（例えば、NK細胞またはNK-T細胞）、または樹状細胞などである。

30

【0144】

ある特定の実施形態では、宿主細胞は、T細胞である。T細胞は、ナイーブT細胞、メモリーT細胞（ T_M ）、幹細胞メモリーT細胞、ヘルパーT細胞（ T_H ）、エフェクターT細胞（ T_E ）、 $\gamma\delta$ T細胞、調節性T細胞（*Treg*）、またはそれらのあらゆる組合せであり得る。 T_M はさらに、セントラルメモリーT細胞（ T_{CM} 、ナイーブT細胞と比較した場合、 $CD62L$ 、 $CCR7$ 、 $CD28$ 、 $CD127$ 、 $CD45RO$ 、および $CD95$ の発現の増加、ならびに $CD54RA$ の発現の減少）、およびエフェクターメモリーT細胞（ T_{EM} 、ナイーブT細胞または T_{CM} と比較した場合、 $CD62L$ 、 $CCR7$ 、 $CD28$ 、 $CD45RA$ の発現の減少、および $CD127$ の発現の増加）のサブセットに分けることができる。

40

【0145】

T細胞は、公知の技術を使用して収集でき、様々な部分集団またはそれらの組合せは、公知の技術によって、例えば抗体に結合する親和性、フローサイトメトリー、または免疫磁気選択によって濃縮または枯渇させることができる。

【0146】

T細胞を所望の核酸でトランスフェクト／形質導入するための方法が記載されており（例えば、米国特許出願公開第2004/0087025号；米国特許第6,410,319号；PCT公報第WO2014/031687号；Brentjens et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5426 (2007)）、所望の標的特異性を有するT細胞を使用する養子移入手順を有するものとして記載されており（例

50

えば、Schmitt et al., Hum. Gen. 20:1240 (2009); Dossett et al., Mol. Ther. 17:742 (2009); Till et al., Blood 112:2261 (2008); Wang et al., Hum. Gene Ther. 18:712 (2007); Kuball et al., Blood 109:2331 (2007); US2011/0243972; US2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243 (2007); Kalos et al., Sci Transl. Med. 3:95ra73 (2011); Porter et al., N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011))、これらの手法は、本明細書における教示に基づき、本開示の融合タンパク質に方向付けられたものを含めて、ここで開示された実施形態に適合されることが意図される。

10

【0147】

この開示に従ってポリヌクレオチド、ベクター、またはタンパク質を内包する場合、本開示の態様として予期される真核宿主細胞としては、ヒト免疫細胞（例えば、ヒト患者自身の免疫細胞）に加えて、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系（発現された多価結合分子のグリコシル化パターンを改変することが可能な改変されたCHO細胞など、米国付与特許公報第2003/0115614号を参照）、COS細胞（例えばCOS-7）、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、HEK293細胞、HepG2細胞、N細胞、3T3細胞、Spodoptera frugiperda細胞（例えば、Sf9細胞）、Saccharomyces cerevisiae細胞、ならびにこの開示によるタンパク質またはペプチドの発現および必要に応じて単離において有用であることが当技術分野において公知の他のあらゆる真核細胞が挙げられる。また、Escherichia coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、ストレプトミセス菌などの原核細胞、またはこの開示によるタンパク質またはペプチドの発現および必要に応じて単離に好適であることが当技術分野において公知のあらゆる原核細胞も予期される。原核細胞からのタンパク質またはペプチドの単離において、特に、封入体からタンパク質を抽出するための当技術分野において公知の技術を使用できることが予期される。本開示の融合タンパク質をグリコシル化する宿主細胞が

20

30

【0148】

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は、選ばれた宿主細胞の成長に必要な栄養素および他の成分を含有する培養培地中で従来の手順に従って培養される。既定培地および複合培地などの様々な好適な培地が当技術分野において公知であり、その例としては、一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよびミネラルが挙げられる。培地はまた、必要に応じて増殖因子または血清のような成分を含有していてもよい。成長培地は、一般的に、例えば、発現ベクターに運搬されている、または宿主細胞に共トランスフェクトされた選択可能マーカーによって補完される薬物選択または必須栄養素の欠乏によって、異種ポリヌクレオチドを含有する細胞を選択すると予想される。

40

【0149】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質は、標的抗原への結合が宿主細胞から活性または応答を惹起するように宿主細胞の表面上で発現される。このような発現されたタンパク質は、T細胞の結合、活性化または誘導の決定など、さらには抗原特異的なT細胞応答の決定などの、宿主細胞（例えば、T細胞）の活性をアッセイするための多数の技術分野で容認された手法のいずれかに従って機能的に特徴付けることができる。その例としては、T細胞増殖、T細胞のサイトカイン放出、抗原特異的T細胞の刺激、MHC拘束性のT細胞刺激、CTL活性（例えば、事前にローディングした標的細胞からの ^{51}Cr またはユーロピウム放出を検出することによって）、T細胞表現型マーカー発現の変化の決定、およびT細胞の機能の他の尺度が挙げられる。これらおよび類似のアッセイを実

50

行するための手順は、例えば、Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998)に見出すことができる。また、Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, Science 281:1309 (1998) およびそこで引用された文献も参照されたい。

【0150】

サイトカインのレベルは、例えば、ELISA、ELISPOT、細胞内サイトカイン染色、およびフローサイトメトリーならびにそれらの組合せ（例えば、細胞内サイトカイン染色とフローサイトメトリー）などの、本明細書に記載され、当技術分野で実施される方法に従って決定することができる。免疫応答の抗原特異的な惹起または刺激の結果生じる免疫細胞増殖およびクローン拡大増殖は、リンパ球、例えば末梢血液細胞の試料中の循環性リンパ球またはリンパ節由来の細胞を単離すること、細胞を抗原で刺激すること、および例えばトリチウム化したチミジンの取り込み、または非放射性アッセイ、例えばMTTアッセイなどによって、サイトカイン生産、細胞増殖および／または細胞生存度を測定することによって決定することができる。Th1免疫応答とTh2免疫応答とのバランスに対する本明細書に記載される免疫原の作用は、例えば、Th1サイトカイン、例えばIFN- γ 、IL-12、IL-2、およびTNF- β 、ならびに2型サイトカイン、例えばIL-4、IL-5、IL-9、IL-10、およびIL-13のレベルを決定することによって検査することができる。

【0151】

ある特定の実施形態では、内因性遺伝子の発現、例えばTCR遺伝子、HLA遺伝子、 β 2M遺伝子、免疫抑制成分の遺伝子（例えば、免疫チェックポイント分子遺伝子）、またはそれらのあらゆる組合せの発現が、改変された免疫細胞（例えば、T細胞）において阻害される。ある特定の実施形態では、TCR遺伝子は、T細胞受容体 α 定常（TRAC）遺伝子、T細胞受容体 β 定常（TRBC）遺伝子、またはその両方である。ある特定の実施形態では、HLA遺伝子は、HLAクラスI遺伝子、HLAクラスII遺伝子、またはその両方である。本明細書で提供される実施形態のいずれかでは、改変された免疫細胞は、免疫応答に関与する1つまたは複数の内因性遺伝子の発現が低減または消失されるように改変されてもよい。例えば、T細胞は、HLA複合体成分、またはTCRもしくはTCR複合体成分の1つまたは複数のポリペプチドの発現が低減または消失されるように改変されてもよい。理論に拘束されることは望まないが、ある特定の内因的に発現される免疫細胞タンパク質は、改変された免疫細胞を受ける同種の宿主によって外来として認識される場合もあり、それにより、改変された免疫細胞（例えば、HLA対立遺伝子）の消失が起こる可能性があり、内因的に発現される受容体（例えば、TCR）を介して移植片対宿主病を媒介する可能性があり、宿主細胞による発現に関して本開示の異種融合タンパク質と競合する可能性があり、または本開示の異種発現された融合タンパク質の結合活性に干渉する可能性がある（例えば、非腫瘍関連抗原に結合し、改変された免疫細胞の抗原特異的融合タンパク質が腫瘍関連抗原に特異的に結合することに干渉する内因性TCR）。したがって、このような内因性遺伝子またはタンパク質の発現または活性を減少させる、阻害する、または消失させることは、同種の宿主の環境における改変された免疫細胞の活性、寛容、または存続を改善でき、一部の実施形態では、細胞の普遍的な（例えば、HLA型に関係なくあらゆるレシピエントへの）投与を可能にする。

【0152】

ある特定の実施形態では、免疫抑制成分の遺伝子（例えば、免疫チェックポイント分子

遺伝子)の発現は、改変された免疫細胞において阻害される。用語「免疫抑制成分」または「免疫抑制成分」は、本明細書で使用される場合、阻害性シグナルを提供して免疫応答の制御または抑制を助けるための、1種または複数の細胞、タンパク質、分子、化合物または複合体を指す。例えば、免疫抑制成分としては、免疫刺激を部分的もしくは完全にブロックする分子；免疫活性化を減少させる、防止する、もしくは遅延させる分子；または免疫抑制を増加させる、活性化する、もしくは上方調節する分子が挙げられる。例示的な免疫抑制成分の標的としては、免疫チェックポイント分子、例えばPD-1、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、HVEM、アデノシン、GAL9、VISTA、CEACAM-1、PVR L2、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、TIM3、A2aR、CD244/2B4、CD160、TIGIT、LAI R-1、PVRIG/CD112R；代謝酵素、例えばアルギナーゼ、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)；免疫抑制性サイトカイン、例えばIL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35；T_{reg}細胞、またはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

10

【0153】

TCR遺伝子(例えば、TCR可変領域またはTCR定常領域をコードする遺伝子；例えば、Torikai et al., Nature Sci. Rep. 6:21757 (2016)；Torikai et al., Blood 119(24):5697 (2012)；およびTorikai et al., Blood 122(8):1341 (2013)を参照、それらに記載の遺伝子編集技術、組成物、および養子細胞療法は、それらの全体が本明細書に取り込まれる)、HLA遺伝子(例えば、α1マクログロブリン、α2マクログロブリン、α3マクログロブリン、β1ミクログロブリン、またはβ2ミクログロブリンをコードする遺伝子)、免疫抑制成分の遺伝子、またはそれらのあらゆる組合せの発現は、改変された免疫細胞において、遺伝子レベル、転写レベル、翻訳レベル、またはその両方で、ノックダウン、ノックアウト、または阻害され得る。TCR、HLA、または免疫抑制成分の遺伝子の発現の例示的な阻害剤としては、阻害性核酸分子およびエンドヌクレアーゼが挙げられる。染色体遺伝子のノックアウトを引き起こす変更としては、例えば、導入されたナンセンス変異(未成熟終止コドンの形成を含む)、ミスセンス変異、遺伝子欠失、および鎖切断、加えて宿主細胞において内因性遺伝子発現を阻害する阻害性核酸分子の異種発現を挙げることができる。

20

30

【0154】

「阻害性核酸」は、標的遺伝子またはmRNA転写物に相補的な配列を有し、標的遺伝子またはmRNA転写物の発現を低減することが可能な短い一本鎖または二本鎖の核酸分子を指すか、またはこのような分子をコードするポリヌクレオチドを指す。阻害性核酸分子としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、二本鎖RNA(dsRNA)分子、短鎖干渉RNA(siRNA分子、shRNA分子、およびエンドリボヌクレアーゼによって調製されたsiRNA(esRNA)分子)が挙げられる。低減された発現は、転写または翻訳のブロック(例えば、立体障害)、標的mRNA転写物の分解、プレmRNAスプライシング部位のブロック、mRNAプロセシングのブロック(例えば、キャッピング、ポリアデニル化)を含む様々なプロセスを介して達成されてもよい。ある特定の実施形態では、阻害性核酸分子は、遺伝子ノックダウン方法のために使用することができる。TCR、HLA、および免疫抑制成分の遺伝子のゲノムおよびmRNA配列は、例えば、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)のGenBankデータベースで公共的に利用可能である。mRNAを標的化する阻害性核酸分子を作製するための方法は当技術分野において公知であり、例えば、Ozcan et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 87:108-119 (2016)に記載されている。阻害性核酸分子を使用して免疫細胞における遺伝子の発現を阻害する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、米国付与前特許公報第2012/0321667号および同第2007/0036773号；Condomines et al., PLoS ON

40

50

E 10 : e 0 1 3 0 5 1 8 (2 0 1 5) ; Ohno et al. , J. Immunother. Cancer 1 : 2 1 (2 0 1 3)) に記載されている。

【0155】

染色体編集は、例えば、エンドヌクレアーゼを使用して実行することができる。「エンドヌクレアーゼ」は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合の切断を触媒することが可能な酵素を指す。ある特定の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、標的化された遺伝子を切断することによって標的化された遺伝子を不活性化または「ノックアウト」することが可能である。エンドヌクレアーゼは、天然に存在する、組換え、遺伝子改変された、または融合エンドヌクレアーゼであり得る。エンドヌクレアーゼによって引き起こされる核酸鎖の切断は、一般的に、相同組換えまたは非相同末端結合 (NHEJ) の別個のメカニズムを介して修復される。相同組換え中、ドナー核酸分子は、遺伝子「ノックイン」に使用されて、標的遺伝子を不活性化することができる。NHEJは、切断部位においてDNA配列に、変化、例えば少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加をもたらすことが多いエラープロン修復プロセスである。NHEJは、標的遺伝子を「ノックアウト」するのに使用することができる。エンドヌクレアーゼの例としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、CRISPR-Casヌクレアーゼ、およびメガヌクレアーゼが挙げられる。

【0156】

「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」 (ZFN) は、本明細書で使用される場合、FokI エンドヌクレアーゼなどの非特異的なDNA切断ドメインに融合したジンクフィンガーDNA結合ドメインを含む融合タンパク質を指す。約30アミノ酸の各ジンクフィンガーモチーフは、約3塩基対のDNAに結合し、ある特定の残基におけるアミノ酸を、三つ組の配列特異性を変更されるように変化させることができる (例えば、Desjarlais et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. 90 : 2256-2260 (1993) ; Wolfe et al. , J. Mol. Biol. 285 : 1917-1934 (1999) を参照)。所望のDNA配列、例えば約9から約18塩基対の範囲の長さを持つ領域に対して結合特異性を生じるように、複数のジンクフィンガーモチーフがタンデムで連結されていてもよい。背景の目的で言えば、ZFNは、ゲノム中の部位特異的なDNA二本鎖切断 (DSB) の形成を触媒することによってゲノム編集を媒介し、DSBの部位におけるゲノムに相同な隣接配列を含む導入遺伝子の標的化された統合は、相同組換え修復によって促進される。代替として、ZFNによって生成したDSBは、非相同末端結合 (NHEJ) による修復を介した標的遺伝子のノックアウトをもたらすことができ、これは、切断部位におけるヌクレオチドの挿入または欠失をもたらすエラープロン細胞修復経路である。ある特定の実施形態では、TCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子のノックアウトは、ZFN分子を使用して作製された挿入、欠失、変異またはそれらの組合せを含む。

【0157】

「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」 (TALEN) は、本明細書で使用される場合、TALEN DNA結合ドメインおよびDNA切断ドメイン、例えばFokI エンドヌクレアーゼを含む融合タンパク質を指す。「TALEN DNA結合ドメイン」または「TALEN」は、1つまたは複数のTALEN反復ドメイン／単位で構成され、これらはそれぞれ、一般的に高度に保存された33~35アミノ酸の配列を有し、12番目および13番目のアミノ酸が分岐している。TALEN反復ドメインは、標的DNA配列へのTALENの結合に関与する。分岐アミノ酸残基、反復可変二残基 (Repeat Variable Di-residue : RVD) と称され、特異的なヌクレオチド認識と関連する。これらのTALENのDNA認識のための天然 (基準の) コードは、12および13位におけるHD配列が、シトシン (C) への結合をもたらし、NGがTに、NIがAに結合し、NNがGまたはAに結合し、NGがTに結合するように決定されており、非基準の (非定型) RVDも公知である (例えば、米国付与前特許公報第20110301073号、そこに記載の非定型RVDは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。TA

LENは、T細胞のゲノムにおける部位特異的な二本鎖切断(DSB)を指示するのに使用することができる。非相同末端結合(NHEJ)は、アニーリングのための配列のオーバーラップがほとんどないかまたは全くない二本鎖切断の両方の側からのDNAをライゲーションし、それによって遺伝子発現をノックアウトするエラーを導入する。代替として、相同組換え修復は、DSBの部位において導入遺伝子を導入でき、導入遺伝子中に相同な隣接配列を提供する。ある特定の実施形態では、TCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子のノックアウトは、TALEN分子を使用して作製された挿入、欠失、変異またはそれらの組合せを含む。

【0158】

「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート/Cas」(CRISPR/Cas)ヌクレアーゼ系は、本明細書で使用される場合、塩基対形成の相補性を介してゲノム内の標的部位(プロトスペーサーとして公知)を認識し、次いで短い保存されたプロトスペーサー会合モチーフ(proto spacer associated motif: PAM)が相補的標的配列の3'の直後にある場合、DNAを切断するのに、CRISPR RNA(crRNA)ガイドCasヌクレアーゼを採用する系を指す。CRISPR/Cas系は、Casヌクレアーゼの配列および構造に基づいて3つの型(すなわち、I型、II型、およびIII型)に分類される。IおよびIII型のcrRNAガイドサーベイランス複合体は、複数のCasサブユニットを必要とする。II型系は、最も研究されているものであり、少なくとも3つの成分: RNAガイドCas9ヌクレアーゼ、crRNA、およびトランス活性化型crRNA(tracrRNA)を含む。tracrRNAは、二重鎖形成領域を含む。crRNAおよびtracrRNAは、Cas9ヌクレアーゼと相互作用し、crRNA上のスペーサーとPAM上流の標的DNA上のプロトスペーサーとの間のワトソン-クリック塩基対形成を介してCas9/crRNA: tracrRNA複合体を標的DNA上の特異的な部位にガイドすることが可能な二重鎖を形成する。Cas9ヌクレアーゼは、crRNAスペーサーによって画定される領域内の二本鎖切断部分を切断する。NHEJによる修復は、標的化された遺伝子座の発現を中断させる挿入および/または欠失をもたらす。代替として、DSBの部位に、相同組換え修復を介して相同な隣接配列を有する導入遺伝子を導入することができる。crRNAおよびtracrRNAは、単一ガイドRNA(sgRNAまたはgRNA)に操作されていてもよい(例えば、Jinek et al., Science 337: 816-21, 2012を参照)。さらに、標的部位に相補的なガイドRNAの領域は、所望の配列を標的化するように変更またはプログラム化することができる(Xie et al., PLOS One 9: e100448, 2014; 米国付与前特許公開第2014/0068797号、米国付与前特許公開第2014/0186843号; 米国特許第8,697,359号、およびPCT公報第WO2015/071474号; これらのそれぞれは参照により取り込まれる)。ある特定の実施形態では、TCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子のノックアウトは、CRISPR/Casヌクレアーゼ系を使用して作製された挿入、欠失、変異またはそれらの組合せを含む。

【0159】

「メガヌクレアーゼ」はまた、本明細書で使用される場合、「ホーミングエンドヌクレアーゼ」とも称され、これは、大きい認識部位(約12から約40塩基対の二本鎖DNA配列)で特徴付けられるエンドデオキシリボヌクレアーゼを指す。メガヌクレアーゼは、配列および構造モチーフに基づいて5つのファミリー: LAGLIDADG、GIY-YIG、HNH、His-CysボックスおよびPD-(D/E)XKに分けることができる。例示的なメガヌクレアーゼとしては、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIIIが挙げられ、それらの認識配列は公知である(例えば、米国特許第5,420,032号および6,833,252号; Belfort et al., Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388, 1997; Du jon

et al., Gene 82:115-118, 1989; Perler et al., Nucleic Acids Res. 22:1125-1127, 1994; Jasin, Trends Genet. 12:224-228, 1996; Gimble et al., J. Mol. Biol. 263:163-180, 1996; Argast et al., J. Mol. Biol. 280:345-353, 1998を参照)。ある特定の実施形態では、天然に存在するメガヌクレアーゼは、TCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子の部位特異的なゲノム改変を促進するのに使用することができる。他の実施形態では、TCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子に対して新規の結合特異性を有する操作されたメガヌクレアーゼは、部位特異的なゲノム改変に使用される（例えば、Porteus et al., Nat. Biotechnol. 23:967-73, 2005; Sussman et al., J. Mol. Biol. 342:31-41, 2004; Epinat et al., Nucleic Acids Res. 31:2952-62, 2003; Chevalier et al., Molec. Cell 10:895-905, 2002; Ashworth et al., Nature 441:656-659, 2006; Paques et al., Curr. Gene Ther. 7:49-66, 2007; 米国付与前特許公報第2007/0117128号; 同第2006/0206949号; 同第2006/0153826号; 同第2006/0078552号; および同第2004/0002092号を参照）。

10

20

【0160】

さらなる実施形態では、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALE-ヌクレアーゼ、CRISPR-Casヌクレアーゼ、またはメガヌクレアーゼを介して、免疫細胞（例えば、T細胞）のTCR遺伝子、HLA遺伝子、または免疫抑制成分の遺伝子座に挿入される。理論に拘束されることは望まないが、融合タンパク質をTCR遺伝子座に標的化することは、融合タンパク質を発現するT細胞の抗腫瘍活性を強化することができる（Eyquem et al., Nature, 543:113-117 (2017)を参照）。

【0161】

他の態様では、(a) 本明細書に記載されるベクターまたは発現構築物、およびベクターまたは発現構築物を宿主細胞に形質導入するための必要に応じた試薬、(b) 本明細書で開示される単離されたポリヌクレオチドもしくは発現ベクター、およびポリヌクレオチドまたは発現ベクターを宿主細胞に形質導入するための必要に応じた試薬、または(c) 本開示の宿主細胞を含むキットが提供される。

30

【0162】

処置方法

ある特定の態様では、本開示において提供される組成物は、被験体における疾患を処置するための方法において使用でき、本方法は、融合タンパク質; 融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター; 融合タンパク質を発現する改変された宿主細胞; またはそれらの医薬組成物を被験体に投与することを含み、疾患は、融合タンパク質に結合した抗原の存在に関連する。ある特定の実施形態では、疾患は、ウイルス感染、細菌感染、がん、炎症性疾患、または自己免疫疾患である。

40

【0163】

用語「がん」は、本明細書において使用される場合、固形腫瘍および血液学的悪性疾患（例えば、白血病）を含む。処置され得る例示的ながんとしては、黒色腫; 非小細胞肺癌; 腎細胞癌; 腎臓がん; 血液がん; 前立腺がん; 去勢抵抗性前立腺がん; 結腸がん; 直腸がん; 胃がん; 食道がん; 膀胱がん; 頭頸部がん; 甲状腺がん; 乳がん; トリプルネガティブ乳がん; 卵巣がん; 子宮頸がん; 肺がん; 尿路上皮がん; 膵臓がん; 膠芽腫; 肝細胞がん; 脳がん; CNSがん; 悪性の神経膠腫、肉腫および癌腫、例えば軟骨肉腫など;

50

線維肉腫（線維芽細胞肉腫）；隆起性皮膚線維肉腫（D F S P）；骨肉腫；横紋筋肉腫；ユーイング肉腫；消化管間質腫瘍；平滑筋肉腫；血管肉腫（血管肉腫）；カボジ肉腫；脂肪肉腫；多形肉腫；滑膜肉腫；P N E T；悪性血管内皮腫；悪性神経鞘腫；骨肉腫；胞状軟部肉腫；血管肉腫；葉状囊肉腫；類腱腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；類上皮肉腫；骨外性軟骨肉腫；骨外性骨肉腫；血管外皮細胞腫；血管肉腫；リンパ管肉腫；リンパ肉腫；未分化多形肉腫；悪性末梢神経鞘腫瘍（M P N S T）；神経線維肉腫；横紋筋肉腫；未分化多形肉腫；扁平上皮癌；腺癌；腺扁平上皮癌；未分化癌；大細胞癌；小細胞癌；乳癌（例えば、非浸潤性乳管癌（非侵襲性）、上皮内小葉癌（非侵襲性）、侵襲性乳管癌、侵襲性小葉癌、非侵襲性癌腫）；肝臓癌（例えば、肝細胞癌、胆管癌または胆管がん）；肺癌（例えば、腺癌、扁平上皮癌（類表皮癌）、大細胞未分化癌、気管支肺胞上皮癌）；卵巣癌（例えば、表層上皮性一間質性腫瘍（腺癌）または卵巣上皮癌（これは、漿液性腫瘍、類内膜腫瘍および粘液性嚢胞腺癌を含む）、類表皮（扁平上皮癌）、胎児性癌および絨毛癌（胚細胞腫瘍））；腎臓癌（例えば、腎腺癌、グラヴィッツ腫瘍（hypernephroma）、移行上皮癌（腎盂）、扁平上皮癌、ペリニ管癌、明細胞腺癌、移行上皮癌、腎盂のカルチノイド腫瘍）；副腎癌（例えば、副腎皮質癌）、精巣癌（例えば、生殖細胞癌（精上皮腫、絨毛癌、胎児性癌（Embryonal carcinoma）、奇形癌）、漿液性癌）；胃癌（例えば、腺癌）；腸癌（例えば、十二指腸腺癌）；結腸直腸癌；または皮膚癌（例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌）；基底細胞癌、腺癌；形成性胃組織炎；ビポーマ；胆管癌；肝細胞癌；腺様嚢胞癌；腎細胞癌；グラビッツ腫瘍、上衣細胞腫；星細胞腫；乏突起細胞腫；脳幹神経膠腫；視神経膠腫（optic nerve glioma）；卵巣癌、卵巣上皮癌、子宮頸部腺癌または小細胞癌、膵臓癌、結腸直腸癌（例えば、腺癌または扁平上皮癌）、肺癌、乳管癌、前立腺腺癌、軟骨肉腫；線維肉腫（線維芽細胞肉腫）；隆起性皮膚線維肉腫（D F S P）；骨肉腫；横紋筋肉腫；多形肉腫；または滑膜肉腫；肺癌（例えば、腺癌、扁平上皮癌（類表皮癌）；扁平上皮癌；腺癌；腺扁平上皮癌；未分化癌；大細胞癌；小細胞癌；乳癌（例えば、非浸潤性乳管癌（非侵襲性）、上皮内小葉癌（非侵襲性）、侵襲性乳管癌、侵襲性小葉癌、非侵襲性癌腫）；肝臓癌（例えば、肝細胞癌、胆管癌または胆管がん）；大細胞未分化癌、気管支肺胞上皮癌）；卵巣癌（例えば、表層上皮性一間質性腫瘍（腺癌）または卵巣上皮癌（これは、漿液性腫瘍、類内膜腫瘍および粘液性嚢胞腺癌を含む）、類表皮（扁平上皮癌）、胎児性癌および絨毛癌（胚細胞腫瘍））；腎臓癌（例えば、腎腺癌、グラヴィッツ腫瘍、移行上皮癌（腎盂）、扁平上皮癌、ペリニ管癌、明細胞腺癌、移行上皮癌、腎盂のカルチノイド腫瘍）；副腎癌（例えば、副腎皮質癌）、精巣癌（例えば、生殖細胞癌（精上皮腫、絨毛癌、胎児性癌、奇形癌）、漿液性癌）；胃癌（例えば、腺癌）；腸癌（例えば、十二指腸腺癌）；結腸直腸癌；または皮膚癌（例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌）；卵巣癌、卵巣上皮癌、子宮頸部腺癌または小細胞癌、膵臓癌、結腸直腸癌（例えば、腺癌または扁平上皮癌）、肺癌、乳管癌、または前立腺腺癌が挙げられる。

【0164】

例示的な血液学的悪性疾患としては、急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性好酸球性白血病（CEL）；骨髄異形成症候群（MDS）；ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）（例えば、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、または慢性リンパ球性白血病）；骨髄腫；多発性骨髄腫（MM）；形質細胞腫；形質細胞性白血病；ワルデンストレームマクログロブリン血症；B細胞リンパ腫；リンパ形質細胞性リンパ腫（lymphoplasmacytic lymphoma）；パーキットリンパ腫；小リンパ球性リンパ腫（SLL）；濾胞性リンパ腫；免疫芽球性大細胞リンパ腫；前駆Bリンパ芽球性リンパ腫；およびマントル細胞リンパ腫；CD37⁺樹状細胞リンパ腫；リンパ形質細胞性リンパ腫；脾性辺縁帯リンパ腫；粘膜関連リンパ組織（MALT）の節外性辺縁帯B細胞リンパ腫；節性辺縁帯B細胞リンパ腫；縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫；血管内大細胞型B細胞リンパ腫；原発性滲出性リンパ腫；成人T細胞リンパ腫；節外性NK/T細胞リンパ腫；鼻型；腸症関連T細胞リンパ腫；肝脾T細胞リンパ腫；芽球型NK細胞リンパ腫；セザ

10

20

30

40

50

リー症候群、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫；未分化大細胞リンパ腫が挙げられる。

【0165】

本明細書で提供される組成物を使用して処置され得る他の疾患としては、ウイルス（例えば、HIV、BKポリオマウイルス、アデノウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、細菌、および寄生生物などの病原微生物による感染が挙げられる。別の態様では、全身性エリテマトーデス、糖尿病、関節リウマチ、反応性関節炎、多発性硬化症、尋常性天疱瘡、セリアック病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、および自己免疫性甲状腺疾患などの自己免疫疾患を処置するための方法が提供される。

【0166】

ある特定の実施形態では、被験体は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ヤギ、マウス、ラット、ウサギ、モルモットである。一実施形態では、被験体は、ヒト、例えばヒト成人、青年、小児、または乳児である。

【0167】

ある特定の実施形態では、被験体に投与される改変された宿主細胞は、自己、同種、または同系である。

【0168】

ある特定の実施形態では、本開示において提供される組成物で処置された被験体は、低いもしくは軽度のサイトカイン放出症候群（CRS）、低いもしくは軽度のCAR T細胞関連脳症症候群（CRE S）、またはその両方を呈示する。ある特定の実施形態では、本開示において提供される組成物で処置された被験体は、参照宿主細胞または組成物が投与された被験体（すなわち、参照被験体または同じ被験体）と比較して、低減されたサイトカイン放出症候群、細胞関連脳症症候群、またはその両方を呈示し、ここで融合タンパク質は、野生型CD28共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0169】

CD19特異的CAR T細胞の臨床適用からのデータは、CD28／CD3ζシグナル伝達ドメインを含むCARは、4-1BB／CD3ζシグナル伝達ドメインを含むCARより、患者において重度のCRSを誘導する可能性が高いことを示唆する（Davilla et al., Sci. Transl. Med. 6:224ra25 (2014); Turtle et al., J. Clin. Invest. 126:2123-2138 (2016)）。本開示によるCD28共刺激シグナル伝達ドメインの改変は、CRS、CRE S、またはその両方の発生率または重症度を低減することができ、これは、ある特定の実施形態では、抗腫瘍細胞傷害を保持しながらシグナル伝達およびサイトカイン生産の強度を低減することによって達成することができる。理論に縛られることはないが、CRSおよびCRE Sは、過剰な炎症を引き起こす深刻なT細胞増殖およびサイトカイン放出の結果として発症する。CRSの症状としては、発熱、倦怠感、筋肉痛、食欲低下、吐き気、頻脈、毛細血管漏出、心臓の機能不全、腎機能障害、肝不全、播種性血管内凝固症候群、低血圧、低酸素症が挙げられ、体内のあらゆる臓器系に影響を与える可能性がある。CRE Sは、錯乱、せん妄、発作、および脳浮腫で特徴付けられる毒性の脳障害状態である。CRSは、重度の免疫活性化、リンパ組織球の組織浸潤、および免疫介在性の多臓器不全によって特徴付けられる激症の血球貪食性リンパ組織球症（HLH）に発展する可能性がある。高い血漿中のサイトカイン、例えば、インターフェロンγ；IL-6；IL-8；sIL-2Rα；可溶性糖タンパク質130（gp130）；sIL-6R；IL-15；IL-8；IL-10；単球走化性タンパク質（MCP1）；マクロファージ炎症性タンパク質（MIP1）-α；MIP1-βおよび顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）などが、特にCAR T細胞処置の早期において、重度のCRSと高度に関連する。CRSの格付けは、発熱、低血圧、低酸素症、および臓器毒性の存在に基づきグレード1から4の範囲であり、重度のCRSは、グレード≥3に割り当てられ、臓器毒性を呈示するか、および／または場合によっては生命

10

20

30

40

50

を脅かすものであり、積極的な臨床的介入を必要とする。グレード1のCRSは、発熱およびグレード1の臓器毒性として生じる可能性があり、一方でグレード2～4については、発熱以外の基準のいずれか1つで十分である。CRSは、神経学的な評価スコアおよび頭蓋内圧の上昇の存在、ならびに発作または運動の衰弱に基づき1～4に格付けされる。CRSおよびCRSを評価するための方法は、当技術分野において公知である（例えば、Neelapu et al., Nat. Rev. Clin. Onc. 15: 47-62 (2018); Lee et al., Blood (2014); CTCAE v4.03; Porter et al. J. Hematol. Oncol. 11: 35 (2018); および Liu and Zhao, J. Hematol. Oncol. 11: 121 (2018)を参照）、これらの方法および格付けシステムは、参照により本明細書に組み込まれる）。ある特定の実施形態では、本開示で提供される組成物で処置された被験体は、その後、3以上のグレードを有するCRSもCRSも示さない。ある特定の実施形態では、低いレベルまたは軽度のCRSまたはCRSは、3未満のグレード、2のグレード、または1のグレードを有するCRSまたはCRSを指す。格付けは、あらゆる当技術分野で容認された方法、スケール、または解説、例えば本明細書に記載されるものなどに従っていてもよい。

10

【0170】

抗原特異的なT細胞応答は、適切な環境で同族の抗原（例えば、免疫適合性の抗原提示細胞によって提示される場合、T細胞を刺激または活性化するのに使用される抗原）に曝露されるT細胞と、その代わりに構造的に異なるまたは関連性がない対照抗原に曝露される同じ供給源の集団からのT細胞との間に生じる可能性がある、本明細書に記載されたT細胞の機能的なパラメーター（例えば、増殖、サイトカイン放出、CTL活性、変更された細胞表面マーカー表現型など）のいずれかによる観察されたT細胞応答の比較によって決定することができる。統計的有意性を有して、対照抗原に対する応答より大きい同族の抗原に対する応答は、抗原特異性を意味する。

20

【0171】

生体試料は、免疫応答の存在およびレベル、例えばCARまたはTCRを発現するT細胞によるサイトカイン放出の存在およびレベルを決定するために、被験体から得ることができる。「生体試料」は、本明細書で使用される場合、血液試料（それから血清または血漿を調製してもよい）、生検検体；体液（例えば、肺洗浄液、腹水、粘膜の洗液、滑液）；骨髓；リンパ節；組織外植片；臓器培養物；または他のあらゆる組織もしくは被験体または生物学的供給源からの細胞調製物であり得る。生体試料はまた、いずれの免疫原性組成物を受ける前に被験体から得てもよく、このような生体試料は、ベースライン（すなわち、免疫化前の）データを確立するための対照として有用である。

30

【0172】

本発明によって処置され得る被験体は、一部の実施形態では、ヒトおよび他の霊長類被験体であり、例えば、獣医学の目的の場合、サルおよび類人猿である。上述の実施形態のいずれかでは、被験体は、ヒト被験体であり得る。被験体は、男性または女性であってもよく、乳児、若年、青年、成人、および老齢の被験体などのあらゆる好適な年齢の被験体であってもよい。本開示による細胞は、医学分野の当業者によって決定される、処置しようとする疾患、状態、または障害に適切な方式で投与することができる。上記実施形態のいずれかでは、本明細書に記載される細胞を含む細胞は、静脈内に、腹腔内に、腫瘍内に、骨髓に、リンパ節に、または脳脊髄液に投与される。組成物の適切な用量、好適な持続時間、および投与の頻度は、患者の年齢、サイズ、性別、および状態；疾患、状態、または障害のタイプおよび重症度；活性成分の特定の形態；ならびに投与方法のような要因によって決定されると予想される。

40

【0173】

本明細書に記載される融合タンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター、または改変された宿主細胞は、薬学的もしくは生理学的に許容される、または好適な賦形剤または担体中で被験体に投与することができる。薬学的に許容される賦形剤は、ヒトまたは他の非ヒト

50

哺乳動物被験体への投与に好適な、生体適合性のビヒクル、例えば、生理的食塩水であり、これらは本明細書においてより詳細に記載される。養子細胞療法の状況における治療有効用量は、処置されたヒトまたは非ヒト哺乳動物において、臨床的に所望の結果（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を統計学的に有意な方式でもたすことが可能な、養子移入で使用される宿主細胞（本開示による結合タンパク質を発現する）の量である。医療分野において周知の通り、いずれか1人の患者ごとの投与量は、患者のサイズ、体重、体表面積、年齢、投与しようとする具体的な療法、性別、投与の時間および経路、全身の健康状態、ならびに並行して投与される他の薬物などの多くの要因によって決まる。用量は、様々であると予想されるが、本明細書に記載される組換え発現ベクターを含む宿主細胞の投与のための好ましい用量は、細胞約 10^5 個/ m^2 、細胞約 5×10^5 個/ m^2 、細胞約 10^6 個/ m^2 、細胞約 5×10^6 個/ m^2 、細胞約 10^7 個/ m^2 、細胞約 5×10^7 個/ m^2 、細胞約 10^8 個/ m^2 、細胞約 5×10^8 個/ m^2 、細胞約 10^9 個/ m^2 、細胞約 5×10^9 個/ m^2 、細胞約 10^{10} 個/ m^2 、細胞約 5×10^{10} 個/ m^2 、または細胞約 10^{11} 個/ m^2 である。

10

【0174】

細胞の数は、組成物が意図される最終的な使用に加えて、そこに含まれる細胞のタイプに依存すると予想される。例えば、ある特定の実施形態では、融合タンパク質を含有するように改変された細胞は、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%のこのような細胞を含有する細胞集団を構成すると予想される。本明細書で提供される使用のために、細胞は、一般的に、1リットルまたはそれ未満、500mlまたはそれ未満、250mlまたはそれ未満、または100mlまたはそれ未満の体積である。実施形態では、所望の細胞の密度は、典型的に細胞 10^4 個/mlより大きく、一般的に、細胞 10^7 個/mlより大きく、一般的に細胞 10^8 個/mlまたはそれより大きい。細胞は、単回の輸注として投与されてもよいし、またはある範囲の時間にわたり複数回の輸注で投与されてもよい。累積的に 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、または 10^{11} 個の細胞に等しいかまたはそれを超える臨床的に関連性のある数の免疫細胞を、複数回の輸注に配分してもよい。

20

【0175】

ある特定の実施形態では、単位用量は、(i) 少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii) 少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない（すなわち、単位用量中に存在するナイーブT細胞の集団は、同等の数のPBM Cを有する患者試料と比較した場合、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満である）。

30

40

【0176】

一部の実施形態では、単位用量は、(i) 少なくとも約50%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii) 少なくとも約50%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。さらなる実施形態では、単位用量は、(i) 少なくとも約60%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii) 少なくとも約60%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。よりさらなる実施形態では、単位用量は、(i) 少なくとも約70%の改変

50

された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約70%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。一部の実施形態では、単位用量は、(i)少なくとも約80%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約80%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。一部の実施形態では、単位用量は、(i)少なくとも約85%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約85%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。一部の実施形態では、単位用量は、(i)少なくとも約90%の改変された、または改変されていないCD4⁺T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約90%の改変された、または改変されていないCD8⁺T細胞を含む組成物との約1:1の比率での組合せを含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含むかまたはそれを実質的に含まない。

10

【0177】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、単位用量は、等しい、またはほぼ等しい数の改変された、または改変されていないCD45RA⁺CD3⁺CD8⁺および改変された、または改変されていないCD45RA⁺CD3⁺CD4⁺T_M細胞を含む。

20

【0178】

また、本明細書で開示される融合タンパク質または融合タンパク質を発現する細胞、および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物も予期される。好適な賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロールなど、およびそれらの組合せが挙げられる。実施形態では、本明細書で開示される融合タンパク質または宿主細胞を含む組成物は、好適な輸注媒体をさらに含む。好適な輸注媒体は、あらゆる等張媒体配合物であってもよく、典型的には、生理食塩液、Normosol R (Abbott) またはPlasma-Lyte A (Baxter)、水中の5%デキストロース、乳酸リンゲル液を利用することができる。輸注媒体は、ヒト血清アルブミンまたは他のヒト血清成分が補充されていてもよい。

30

【0179】

医薬組成物は、医学分野の当業者によって決定される処置（または防止）しようとする疾患または状態に適切な方式で投与することができる。組成物の適切な用量および好適な持続時間および投与の頻度は、患者の健康状態、患者のサイズ（すなわち、体重、大きさ、または体表面積）、患者の疾患のタイプおよび重症度、活性成分の特定の形態、ならびに投与方法のような要因によって決定されると予想される。一般的に、適切な用量および処置レジメンは、治療的および／または予防的な利益（例えば、本明細書に記載されるようなものであり、例えば、臨床転帰の改善、例えばより高頻度の完全もしくは部分寛解、またはより長い無病および／もしくは全生存、または症状重症度の低減など）を提供するのに十分な量で組成物を提供する。予防的使用の場合、用量は、疾患または障害に関連する疾患を防止する、その発症を遅延させる、または疾患または障害に関連する疾患の重症度を低減するのに十分な用量と予想される。本明細書に記載される方法に従って投与される免疫原性組成物の予防的な利益は、前臨床（in vitroおよびin vivoの動物実験を含む）および臨床研究を実行すること、およびそれから得られたデータを、全て当業者により容易に実施することができる適切な統計学的、生物学的および臨床的な方法および技術によって分析することによって決定することができる。

40

【0180】

本明細書に記載される医薬組成物は、単位用量または複数回用量用の容器で、例えば密封したアンプルまたはバイアルで提供されてもよい。このような容器は、配合物の安定性を保つために凍結されてもよい。ある特定の実施形態では、単位用量は、本明細書に記載

50

される組換え宿主細胞を、細胞約 10^5 個/ m^2 から細胞約 10^{11} 個/ m^2 の用量で含む。様々な処置レジメンで本明細書に記載される特定の組成物を使用するのに好適な投与量および処置レジメンの開発は、例えば、非経口または静脈内の投与または配合物を含む。

【0181】

対象組成物が非経口的に投与される場合、組成物はまた、滅菌された水性または油性の溶液または懸濁物を含んでいてもよい。好適な非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒としては、水、リンゲル液、等張塩溶液、1, 3-ブタンジオール、エタノール、水との混合物の形態のプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールが挙げられる。水性の溶液または懸濁物は、1種または複数の緩衝化剤、例えば酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウムまたは酒石酸ナトリウムをさらに含んでいてもよい。当然ながら、あらゆる投薬単位配合物の調製で使用されるあらゆる材料が、採用される量で、薬学的に純粋であり、実質的に非毒性であるべきである。加えて、持続放出調製物および配合物に、活性化化合物が取り込まれていてもよい。投薬単位形態は、本明細書で 사용되는場合、処置しようとする被験体のための一体的な投与量として適した物理的に別々の単位を指し、各単位は、適切な医薬用担体と共に、所望の治療作用を生じるように計算された、予め決定された量の組換え細胞または活性化化合物を含有していてもよい。

【0182】

一般的に、適切な投薬および処置レジメンは、活性な分子または細胞を、治療または予防的な利益を提供するのに十分な量で提供する。このような応答は、処置されていない被験体と比較して、処置された被験体における臨床転帰の改善（例えば、より高頻度の完全または部分寛解、またはより長い無病生存）を確立することによってモニターすることができる。以前から存在する腫瘍タンパク質に対する免疫応答における増加は、一般的に、臨床転帰の改善と相関する。このような免疫応答は、一般的に、処置の前および後に被験体から得られた試料を使用して実行できる標準的な増殖、細胞傷害またはサイトカインアッセイを使用して、評価することができる。

【0183】

ある特定の実施形態では、疾患を処置する方法は、改変された免疫細胞を、1種または複数の追加の薬剤と組み合わせて投与することを含む。

【0184】

ある特定の実施形態では、本開示の改変された免疫細胞は、免疫抑制成分の阻害剤と共に被験体に投与される。

【0185】

用語「免疫抑制成分 (immune suppression component)」または「免疫抑制成分 (immunosuppression component)」は、本明細書で 사용되는場合、免疫応答の制御または抑制を助けるための阻害性シグナルを提供する、1種または複数の細胞、タンパク質、分子、化合物または複合体を指す。例えば、免疫抑制成分としては、免疫刺激を部分的または完全にブロックする分子；免疫活性化を減少させる、防止する、もしくは遅延させる分子；または免疫抑制を増加させる、活性化する、もしくは上方調節する分子が挙げられる。例示的な免疫抑制成分の標的は、本明細書でさらに詳細に記載されており、その例としては、免疫チェックポイント分子、例えば PD-1、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、HVEM、アデノシン、GAL9、VISTA、CEACAM-1、PVR L2、CTLA-4、BTLA、KIR、LAG3、TIM3、A2aR、CD244/2B4、CD160、TIGIT、LAIR-1、PVRIG/CD112R；代謝酵素、例えばアルギナーゼ、インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ (IDO)；免疫抑制性サイトカイン、例えば IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35；T_{reg} 細胞、またはそれらのあらゆる組合せが挙げられる。

【0186】

免疫抑制成分の阻害剤は、化合物、抗体、抗体断片もしくは融合ポリペプチド（例えば

、Fc融合、例えばCTLA4-FcまたはLAG3-Fc）、アンチセンス分子、リボザイムもしくはRNAi分子、または低分子量の有機分子であり得る。本明細書で開示された実施形態のいずれかでは、方法は、改変された免疫細胞を、以下の免疫抑制成分のいずれか1種の1種または複数の阻害剤と共に、単独で、またはあらゆる組合せで投与することを含んでいてもよい。

【0187】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、PD-1阻害剤、例えばPD-1特異的抗体またはその結合断片、例えばピディリズマブ、ニボルマブ（キイトルーダ、以前はMDX-1106）、ペンブロリズマブ（オプジーボ、以前はMK-3475）、MED10680（以前はAMP-514）、AMP-224、BMS-936558またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

10

【0188】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、PD-L1特異的抗体またはその結合断片、例えばBMS-936559、デュルバルマブ（MED14736）、アテゾリズマブ（RG7446）、アベルマブ（MSB0010718C）、MPDL3280A、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

【0189】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、LAG3阻害剤、例えばLAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

20

【0190】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、CTLA4の阻害剤と組み合わせて使用される。特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、CTLA4特異的抗体またはその結合断片、例えばイピリムマブ、トレメリムマブ、CTLA4-Ig融合タンパク質（例えば、アバタセプト、ベラタセプト）、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

【0191】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、B7-H3特異的抗体またはその抗原結合断片、例えばエノブリツズマブ（enoblituzumab）（MGA271）、376.96、またはその両方と組み合わせて使用される。

30

【0192】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、B7-H4特異的抗体またはその結合断片、例えば、例えば、Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013に記載されているような、scFvまたはその融合タンパク質、加えて米国特許第9,574,000号ならびにPCT特許公報第WO2016/40724号および同第WO2013/025779号に記載されているものと組み合わせて使用される。

【0193】

一部の実施形態では、改変された免疫細胞は、CD244の阻害剤と組み合わせて使用される。

40

【0194】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、BLTA、HVEM、CD160の阻害剤、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。抗CD160抗体は、例えば、PCT公報第WO2010/084158号に記載されている。

【0195】

さらなる実施形態では、改変された免疫細胞は、TIM3の阻害剤と組み合わせて使用される。

【0196】

よりさらなる実施形態では、改変された免疫細胞は、Gal9の阻害剤と組み合わせて使用される。

50

【0197】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、アデノシンシグナル伝達の阻害剤、例えばデコイアデノシン受容体と組み合わせて使用される。

【0198】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、A2aRの阻害剤と組み合わせて使用される。

【0199】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、KIRの阻害剤、例えばリリルマブ (lirilumab) (BMS-986015) と組み合わせて使用される。

【0200】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、阻害性サイトカイン (典型的には、TGFβ以外のサイトカイン) またはTregの発生または活性の阻害剤と組み合わせて使用される。

【0201】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、IDO阻害剤、例えばレボ-1-メチルトリプトファン、エパカドスタット (INCB024360; Liu et al., Blood 115:3520-30, 2010)、エブセレン (Terentis et al., Biochem. 49:591-600, 2010)、インドキシモド、NLG919 (Mautino et al., American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013)、1-メチルトリプトファン (1-MT) -チラパザミン、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

【0202】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、アルギナーゼ阻害剤、例えばN (オメガ) -ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME)、N-オメガ-ヒドロキシーノル-L-アルギニン (ノル-NOHA)、L-NOHA、2 (S) -アミノ-6-ボロノヘキサン酸 (ABH)、S- (2-ボロノエチル) -L-システイン (BEC)、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

【0203】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、VISTAの阻害剤、例えばCA-170 (Curis, Lexington, MA) と組み合わせて使用される。

【0204】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、LAIR1阻害剤と組み合わせて使用される。

【0205】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5の阻害剤、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用される。

【0206】

ある特定の実施形態では、改変された免疫細胞は、刺激性免疫チェックポイント分子の活性を増加させる (すなわち、アゴニストである) 薬剤と組み合わせて使用される。例えば、改変された免疫細胞は、CD137 (4-1BB) アゴニスト (例えば、ウレルマブなど)、CD134 (OX-40) アゴニスト (例えば、MED16469、MED16383、またはMED10562など)、レナリドマイド、ボマリドマイド、CD27アゴニスト (例えば、CDX-1127など)、CD28アゴニスト (例えば、TGN1412、CD80、またはCD86など)、CD40アゴニスト (例えば、CP-870、893、rhucd40L、またはSGN-40など)、CD122アゴニスト (例えば、IL-2など)、GITRのアゴニスト (例えば、PCT特許公報第WO2016/054638号に記載されるヒト化モノクローナル抗体など)、もしくはICOS (CD2

10

20

30

40

50

78) のアゴニスト (例えば、GSK3359609、mAb88.2、JTX-2011、Icos145-1、またはIcos314-8など)、またはそれらのあらゆる組合せと組み合わせて使用することができる。本明細書で開示された実施形態のいずれかでは、方法は、改変された免疫細胞を、単独の、またはあらゆる組合せの、前述したもののいずれかなどの刺激性免疫チェックポイント分子の1種または複数のアゴニストと共に投与することを含んでいてもよい。

【0207】

他の実施形態では、本開示の方法は、標的化される固形腫瘍によって発現されるがん抗原に特異的な抗体または抗原結合断片；化学療法剤；外科手術；放射線療法処置；サイトカイン；RNA干渉療法の1つまたは複数、またはそれらのあらゆる組合せを含む二次療法を投与することをさらに含む。

10

【0208】

がん療法において有用な例示的なモノクローナル抗体としては、例えば、Galluzzi et al., Oncotarget 5 (24): 12472-12508 (2014) (そこに記載の抗体は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるモノクローナル抗体が挙げられる。

【0209】

ある特定の実施形態では、併用療法の方法は、改変された免疫細胞を投与すること、および被験体に放射線処置または外科手術をさらに施すことを含む。放射線療法としては、X線療法、例えばガンマ放射線照射、および放射線医薬療法が挙げられる。所与のがんまたは非炎症性固形腫瘍を処置するのに適切な手術および外科的技術を、本開示の改変された免疫細胞と組み合わせて被験体において使用することができる。

20

【0210】

ある特定の実施形態では、併用療法の方法は、改変された免疫細胞および化学療法剤を被験体に投与することを含む。化学療法剤としては、これらに限定されないが、クロマチン機能の阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管阻害薬、DNA傷害剤、代謝拮抗物質 (例えば葉酸拮抗剤、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、および糖修飾されたアナログ)、DNA合成阻害剤、DNA相互作用剤 (例えばインターカレート剤)、およびDNA修復阻害剤が挙げられる。例示的な化学療法剤としては、これらに限定されないが、以下の群：代謝拮抗物質／抗がん剤、例えばピリミジンアナログ (5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン) およびプリンアナログ、葉酸拮抗剤および関連の阻害剤 (メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび2-クロロデオキシアデノシン (クラドリビン))；抗増殖剤／抗有糸分裂剤、例えば、ビンカアルカロイド (ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびビノレルビン)、微小管破壊剤、例えばタキサン (パクリタキセル、ドセタキセル)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロンおよびナベルビン、エビジボドフィロトキシシン (エトポシド、テニポシド)、DNA傷害剤 (アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン (merchlorehtamine)、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テモゾロミド (temozolamide)、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびエトポシド (VP16)) など；抗生物質、例えばダクチノマイシン (アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン (ミトラマイシン) およびマイトマイシン；酵素 (L-アスパラギンを全身代謝し、それ自体のアスパラギンを合成する能力を有さない細胞を枯渇させるL-アスパラギナーゼ)；抗血小板剤；抗増殖剤／抗有糸分裂性アルキル化剤、例えばナイトロジェンマスタード (メクロレタミン、シクロホスファミドおよびアナログ、メルファ

30

40

50

ラン、クロラムブシル)、エチレンイミンおよびメチルメラミン(ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ)、アルキルスルホネートであるブスルファン、ニトロソウレア(カルムスチン(BCNU)およびアナログ、ストレプトゾシン)、トリアゼン類(triazines)であるダカルバジン(dacarbazine)(DTIC);抗増殖性/抗有糸分裂性の代謝拮抗物質、例えば葉酸アナログ(メトトレキセート);白金配位錯体(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド;ホルモン、ホルモンアナログ(エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ピカルタミド、ニルタミド)およびアロマターゼ阻害剤(レトロゾール、アナストロゾール);抗凝血剤(ヘパリン、合成ヘパリン塩および他のトロンビン阻害剤);線維素溶解剤(例えば組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ);アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ;抗遊走剤(antimigratory agent);抗分泌剤(ブレフェルジン(breveferdin));免疫抑制剤(シクロスポリン、タクロリムス(FK-506)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル);抗血管新生化合物(TNP470、ゲニステイン)および増殖因子阻害剤(血管内皮増殖因子(VEGF)阻害剤、線維芽細胞増殖因子(FGF)阻害剤);アンジオテンシン受容体ブロッカー;酸化窒素供与体;アンチセンスオリゴヌクレオチド;抗体(トラスツズマブ、リツキシマブ);キメラ抗原受容体;細胞周期阻害剤および分化誘導物質(トレチノイン);mTOR阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤(ドキシソルビシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド(eniposide)、エビルビシン、エトポシド、イダルビシン、イリノテカン(CPT-11)およびミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド(コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、プレドニゾン、およびプレドニゾロン(prednisolone));増殖因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤;ミトコンドリア機能不全誘導物質(mitochondrial dysfunction inducer)、コレラ毒素、リシン、Pseudomonas外毒素、Bordetella pertussisのアデニル酸シクラーゼ毒素、またはジフテリア毒素などの毒素、およびカスパーゼ活性化剤;ならびにクロマチン破壊剤が挙げられる。

【0211】

サイトカインは、抗がん活性に対する宿主免疫応答を操作するのに使用することができる。例えば、Floros and Tarhini, Semin. Oncol. 42:539, 2015を参照されたい。抗がんまたは抗腫瘍応答を促進するのに有用なサイトカインとしては、例えば、単独の、またはあらゆる組合せでの、IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24、およびGM-CSFが挙げられる。

【0212】

別のがん療法アプローチは、がん細胞による成長、維持、増殖、および免疫回避に必要な癌遺伝子および他の遺伝子の発現を低減することを含む。RNA干渉、および特にマイクロRNA(miRNA)阻害的低分子RNA(siRNA)の使用は、がん遺伝子の発現をノックダウンするためのアプローチを提供する。例えば、Larsson et al., Cancer Treat. Rev. 16:128, 2017を参照されたい。

【0213】

本明細書で開示された実施形態のいずれかでは、治療剤(例えば、改変された免疫細胞、免疫抑制成分の阻害剤、刺激性免疫チェックポイント分子のアゴニスト、化学療法剤、放射線療法、外科手術、サイトカイン、または阻害性RNA)のいずれかは、処置経過にわたり、1回で投与してもよいし、または1回より多く被験体に投与してもよく、組合せの形態の場合、あらゆる順番で(例えば、同時に、並行して、またはあらゆる順序で)、

またはあらゆる組合せで被験体に投与してもよい。組成物の適切な用量、好適な持続時間、および投与の頻度は、患者の状態；腫瘍またはがんのサイズ、タイプ、伝播、成長、および重症度；活性成分の特定の形態；ならびに投与方法のような要因によって決定されると予想される。

【0214】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される改変された免疫細胞の複数の用量が被験体に投与され、これは、約2から約4週間の投与間の間隔で投与されてもよい。さらなる実施形態では、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-15、IL-21）は、逐次的に投与され、ただしサイトカイン投与の前に、被験体には組換え宿主細胞が少なくとも3回または4回投与された。ある特定の実施形態では、サイトカインは、宿主細胞と同時に投与される。ある特定の実施形態では、サイトカインは、皮下に投与される。

10

【0215】

よりさらなる実施形態では、処置されている被験体は、免疫抑制療法、例えばカルシニューリン阻害剤、コルチコステロイド、微小管阻害剤、低用量のミコフェノール酸プロドラッグ、またはそれらのあらゆる組合せをさらに受けている。よりさらなる実施形態では、処置されている被験体は、骨髄非破壊的または骨髄破壊的な造血細胞移植を受けたことがあり、この場合、処置は、骨髄非破壊的な造血細胞移植の少なくとも2ヶ月後から少なくとも3ヶ月後に施され得る。

【0216】

有効量の治療または医薬組成物は、投薬のとき、および必要な期間にわたり、本明細書に記載されるような所望の臨床結果または有益な処置を達成するのに十分な量を指す。有効量は、1つまたは複数の投与で送達することができる。投与が、疾患または疾患状態を有することがすでにわかっているかまたは確認された被験体に対する場合、用語「治療量」は、処置に関して使用することができ、それに対して「予防有効量」は、疾患または疾患状態（例えば、再発）を発症しやすいかまたはそのリスクがある被験体に、防止的な過程として有効量を投与することを述べるのに使用することができる。

20

【実施例】

【0217】

（実施例1）

材料および方法

健康なドナーからの末梢血T細胞の獲得

健康な成人（>18歳）を、施設内倫理審査委員会によって承認された末梢血液収集に関する研究に登録した。インフォームドコンセントを全ての登録者から得た。研究参加者に関する全ての個人を特定できる情報に対して研究者を盲検化し、ドナーの年齢と特徴を示さないドナーID番号のみを提供した。静脈穿刺によって400ccの末梢血液を収集し、リンパ球分離培地（Corningカタログ番号25-072-CV）を使用した密度勾配によって単核細胞（PBMC）を単離した。EasySepヒトCD8⁺T細胞単離キット（Stem Cell Technologiesカタログ番号17952および17953）を使用して、CD4⁺およびCD8⁺T細胞を単離し、CD62L-PE（ThermoFisherカタログ番号12-0629-42）での染色、それに続くEasySepヒトPE選択キット（Stem Cell Technologiesカタログ番号18551）によって、CD8⁺CD62L⁺T細胞をさらに濃縮した。単離を製造元の指示に従って実行した。

30

40

【0218】

細胞培養

293T Lentix細胞（Clontechカタログ番号632180）を、10%ウシ胎仔血清、1mMのL-グルタミン（Gibco）、および100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco）が補充されたDMEM（Gibco）中で培養した。K562（CCL-243）およびJurkat（TIB-152）細胞をATCCから得て、5%ウシ胎仔血清および100U/mLペニシリン/ストレプトマイシンが

50

補充されたRPMI-1640 (Gibco) 中で培養した。初代ヒトT細胞を、10%ヒト血清、2mMのL-グルタミン、100U/mLペニシリン/ストレプトマイシン、50μMのβ-メルカプトエタノール (Sigma)、および50U/mLのIL-2 (Prometheus Proleukin/アルデスロイキン) が補充されたRPMI-1640からなるCTL培地中で培養した。全ての細胞を37℃および5%CO₂で培養し、2ヶ月に1回、MycAlertマイコプラズマ検出キット (Lonzaカタログ番号LT07-318) を使用してマイコプラズマの非存在に関して試験した。

【0219】

キメラ抗原受容体 (CAR) および組換えレンチウイルスベクターの生成

CD19特異的およびROR1特異的なCAR構築物は、これまでに記載されている (Hudecek et al., Clin. Cancer Res. 19:3153-3164 (2013); Sommermeyer et al., Leukemia 30:492-500 (2016) (図1A))。単一のStreptag II配列 (配列番号10) および2つのG₄Sリンカーを、FMC63 (配列番号8) またはR12単鎖可変断片 (配列番号9) とIgG4のヒンジ配列 (配列番号12) との間に挿入した (Liu et al., Nat. Biotechnol. 34:430-434 (2016))。これらを、ヒトCD28の27アミノ酸の膜貫通ドメイン (UniProt: P10747; 配列番号13) に、さらに、(i) 天然CD28タンパク質の186~187位に配置されたLLからGGの置換を有するヒトCD28の41アミノ酸の細胞質ドメイン (Nguyen et al., Blood 102:4320-4325 (2003) (配列番号3)、または(ii) ヒト4-1BBの42アミノ酸の細胞質ドメイン (UniProt: Q07011; 配列番号14) のいずれかを含みシグナル伝達モジュールに連結し、これらのそれぞれを、ヒトCD3ζのアイソフォーム3の112アミノ酸の細胞質ドメイン (UniProt: P20963-3; 配列番号15) に連結した。CD28のUniProt位置206、209、および218においてチロシンからフェニルアラニンへの置換を有する変異体CD28/CD3ζ CARを部位特異的変異誘発によって生成した。全てのCAR遺伝子構築物を、T2A (配列番号16) をコードする配列によってトランケート型上皮増殖因子受容体をコードする配列 (EGFRt; 配列番号17) に連結し、コドン最適化し、HIV7レンチウイルスベクターにクローニングした。抗原陽性K562細胞を作製するために、ヒトCD19のアミノ酸1~325 (UniProt: P15391) をHIV7レンチウイルスベクターにクローニングし、ヒトROR1のアミノ酸1~937 (UniProt: Q01973) をmp71レトロウイルスベクターにクローニングした。全てのクローニングを、PCR、酵素消化、および/またはギブソンアセンブリによって実行した。プラスミドをキャピラリーシーケンシングおよび制限酵素消化によって検証した。

【0220】

レンチウイルスの調製および形質導入

CAR T細胞を調製するために、LentiX細胞を、HIV7 CARベクター、加えてpsPAX2 (Addgeneカタログ番号12260) およびpMD2.G (Addgeneカタログ番号12259) パッケージングプラスミドを用いて一時的にトランスフェクトした。1日後 (1日目)、初代T細胞をDynabeadsヒトT-活性化剤CD3/CD28 (ThermoFisherカタログ番号11132D) を使用して活性化し、50U/mLのIL-2が補充されたCTL中で培養した。次の日 (2日目)、レンチウイルスの上清をLentiX細胞から回収し、0.45μmのPESシリンジフィルター (Milliporeカタログ番号SLHP033RB) を使用してろ過し、活性化されたT細胞に添加した。ポリブレン (Milliporeカタログ番号TR-1003-G) を添加して、4.4μg/mLの最終濃度にし、細胞を800×gおよび32℃で90分、スピノ接種 (spinoculated) した。8時間後にウイルス上清を50U/mLのIL-2が補充された新しいCTLと交換した。次いで48時間毎に、半分の培地交換を、50U/mLのIL-2が補充されたCTLを使用して行った。6日

目に Dynabeads を除去した、9 日目に、CD8⁺EGFRt⁺ 形質導入 T 細胞を、FACS Aria II (BD Biosciences) で FACS 選別した。

【0221】

K562/CD19 細胞を調製するために、LentiX 細胞を、pSPAX2、pMD2.G、および CD19 をコードする HIV7 レンチウイルスベクターで一時的にトランスフェクトした。K562/ROR1 細胞を調製するために、LentiX 細胞を、MLVg/p、10A1、および ROR1 をコードする mp71 レトロウイルスベクターで一時的にトランスフェクトした (Ucker et al., Hum. Gene Ther. 11:1005-1014 (2000))。2 日後、ウイルス上清を、0.45 μm の PES シリンジフィルターを使用してろ過し、K562 細胞に添加した。5 日後、形質導入された K562 細胞を、CD19 に特異的なモノクローナル抗体 (Biolegend カタログ番号 302212) または ROR1 に特異的なモノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec カタログ番号 130-098-317) で染色し、FACS Aria II で FACS 選別した。

【0222】

質量分析および機能分析のための T 細胞の拡大増殖

MS および/または機能分析の前に、FACS 選別した CD8⁺EGFRt⁺ 細胞を単回の刺激サイクルにわたり拡大増殖した。CD19 特異的 CAR-T 細胞を、CD19⁺ リンパ芽球様細胞系 (LCL) との、1:7 (T 細胞:LCL) の比率での共培養によって拡大増殖させ、刺激の 8 日後にアッセイした。ROR1 特異的 CAR-T 細胞を、精製した OKT3、LCL、放射線照射した PBMC を含有する迅速拡大増殖プロトコルを使用して拡大増殖させ、刺激の 11 日後にアッセイした。拡大増殖中、2~3 日毎に、培養物に 50 U/mL の IL-2 を含有する新しい CTL 培地を供給した。

【0223】

フローサイトメトリーおよび細胞表現型決定

T 細胞を、BD Biosciences、ThermoFisher、または Biolegend から購入した 1:100 希釈のフルオロフォアコンジュゲートモノクローナル抗体で染色した。セツキシマブ (抗 EGFR、Bristol Myers Squibb) および 3E8 (抗 STII、FHCRC) mAb を、EZ-Link Sulfo-NHS-ビオチンキット (ThermoFisher カタログ番号 21217) を使用してビオチン化し、続いて Zeba Spin 脱塩カラム (ThermoFisher カタログ番号 89882) でクリーニングし、これを、ストレプトアビジン-APC (ThermoFisher カタログ番号 17-4317-82) と共に T 細胞を染色するのに使用した。T 細胞を 70% の氷冷エタノールで固定し、1% Triton (登録商標)-X (Sigma カタログ番号 T8787) で細胞を透過化し、100 μg/mL の RNase A (ThermoFisher カタログ番号 EN0531) で RNA を分解し、20 μg/mL ヨウ化プロピジウム (ThermoFisher カタログ番号 P3566) で DNA を染色することによって、DNA 含量の染色を実行した。全てのデータを FACS Canto II (BD Biosciences) に収集し、FlowJo バージョン 9 (TreeStar) で分析した。

【0224】

抗 STII および対照ビーズの調製

1 mL のストレプトアビジンでコーティングした磁気粒子 (Spherotech カタログ番号 SVM5-30-10) を、100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン (PBS+P/S) が補充された過量の 1×PBS 中で卓上型の磁石を使用して 1 回洗浄した。1 mL の PBS+P/S 中にビーズペレットを再懸濁することによって、抗 STII ビーズを調製した。ボルテックスで混合しながら、1 mL のビーズ当たり 16.67 μg の抗 STII mAb (GenScript カタログ番号 A01737) を添加した。ビーズおよび抗 STII 抗体を 3D オービタルシェーカー上で終夜インキュベートし、卓上型の磁石を使用して過量の PBS+P/S で 3 回洗浄し、4 mL の PBS+P/S 中に再

懸濁した。対照ビーズを作製するために、1 mLのストレプトアビジンでコーティングされた磁気粒子を、卓上型の磁石を使用して1回洗浄し、ビーズペレットを4 mLのPBS + P/S中に再懸濁した。全てのビーズを4℃で貯蔵した。

【0225】

細胞刺激、タンパク質溶解産物、およびRNA単離

CAR TまたはJurkat細胞を洗浄し、温かいCTL培地中に再懸濁した。OKT3刺激のために、細胞を、1.25 µg/mLのOKT3 (Biolegendカタログ番号317303)と共に氷上で5分、次いで、5 µg/mLの抗マウスIgG (ThermoFisherカタログ番号A16068)と共に氷上で10分インキュベートした。細胞を37℃の水浴に移して、シグナル伝達を開始させた。K562細胞ベースの刺激のために、CAR T細胞を、37℃の水浴中、4:1のエフェクターと標的との比率で、K562またはK562/CD19細胞と共培養した。ビーズベースの刺激のために、T細胞を、37℃の水浴中、細胞1×10⁶個当たり30 µLのビーズの比率で、STIIまたは対照マイクロビーズと共にインキュベートした(図1B)。配分された時間の後、細胞を、氷冷PBSを使用して2回迅速に洗浄し、次いで、1:100希釈での、プロテアーゼ (Sigmaカタログ番号P8340-1ML) およびホスファターゼ阻害剤 (Sigmaカタログ番号P5726-1MLおよびP0044-1ML) が補充された、6 Mの尿素、25 mMのトリス (pH 8.0)、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA溶液中で溶解させた。これをここでは溶解緩衝液と称する。溶解産物を15秒間超音波処理し、その後、10,000×gおよび4℃で10分遠心分離した。溶解産物の清澄化中にビーズを除去した。6時間の刺激の後、RNA単離を、NucleoSpin RNAキット (Macherey-Nagelカタログ番号740955)を製造元の指示に従って使用して実行した。細胞溶解の前に、卓上型の磁石を使用してビーズを除去した。

【0226】

タンパク質消化、TMT標識化、およびホスホチロシン (pTyr) ペプチド免疫沈降
溶解産物中のタンパク質をマイクロBCAアッセイ (ThermoFisherカタログ番号23235)によって定量化し、溶解産物を、溶解緩衝液を使用して2 mg/mLに希釈した。溶解産物を、振盪しながら、37℃で30分、24 mMのTCEP (ThermoFisherカタログ番号77720)中で還元し、続いて、暗所で、室温で30分、48 mMのヨードアセトアミド (Sigmaカタログ番号A3221)でアルキル化した。次いで溶解産物を、200 mMのトリス (pH 8.0)で2 Mの尿素濃度に希釈した。Lys-C (Wakoカタログ番号125-05061)を、25 mMのトリス (pH 8.0)中に200 µg/mLで溶解し、1:100 (酵素:タンパク質)の質量比で溶解産物に添加し、振盪しながら、37℃で2時間インキュベートした。試料をさらに200 mMのトリス (pH 8.0)で1 Mの尿素濃度に希釈し、その後、1:50のトリプシン:タンパク質の比率でトリプシンを添加した。2時間後、第2のトリプシンアリコート、1:100のトリプシン:タンパク質の比率で添加した。消化を、振盪しながら37℃で終夜行った。16時間後、1体積%の最終濃度までのギ酸で、反応をクエンチした。Oasis HLB 96-ウェルプレート (Watersカタログ番号WAT058951)および正圧マニホールド (Watersカタログ番号186005521)を使用して試料を脱塩した。プレートのウェルを、3×400 µLの50% MeCN/0.1% FAで洗浄し、次いで4×400 µLの0.1% FAで平衡化した。消化物をウェルに適用し、次いで4×400 µLの0.1% FAで洗浄し、その後、3×400 µLの50% MeCN/0.1% FAを一滴ずつ用いて溶出させた。溶出液を凍結乾燥し、続いて使用まで-80℃で貯蔵した。TMT標識化 (ThermoFisher、カタログ番号90406)のために、脱塩したペプチドを、開始タンパク質量に基づき1 mg/mLで50 mMのHEPES中に再懸濁した。TMT試薬を257 µLのMeCN中に再懸濁し、ペプチド試料に移した。試料を室温で混合しながら1時間インキュベートした。標識化反応を、50 µLの5%ヒドロキシルアミン (Sigmaカタログ番号438227)の添加によってクエンチし、混合しながら室温で15分インキュベートした。次いで独立し

た標識化反応物を一緒にプールし、凍結乾燥した。標識されたペプチドを上記した通りに脱塩し、次いで凍結乾燥し、 -80°C で貯蔵した。次いで、pTyrペプチド (Cell Signalingカタログ番号8803) の免疫沈降を製造元の指示の通りに実行した。濃縮されたpTyrペプチド画分を、C18 Spin Tip (ThermoFisherカタログ番号84850) を使用して精製し、凍結乾燥し、分析まで -80°C で貯蔵した。フロースルー画分を脱塩し、凍結乾燥し、 -80°C で貯蔵した。

【0227】

塩基性 (高pH) 逆相液体クロマトグラフィー

脱塩したpTyrペプチド枯渇フロースルーを、高pH逆相 (RP) 液体クロマトグラフィーによって分画した。4mgのタンパク質消化物を、5mMの NH_4HCO_3 (pH 10) (A) および90%MeCN中の5mMの NH_4HCO_3 (pH 10) (B) の移動相を有するAgilent 1200 HPLCからなるLCシステム上にローディングした。4.6mm $\times$ 250mmのZorbax Extend-C18、3.5 μm のカラム (Agilentカタログ番号770953-902) によって、96分にわたり、1.0mL/分の流量で、以下のタイムテーブルによってペプチドを分離した: 0%のBで9分の保持、4分にわたり0から10%のB、50分にわたり10から28.5%のB、5.5分にわたり28.5から34%のB、13分にわたり34から60%のBの勾配、8.5分にわたり60%のBでの保持、1分にわたり60から0%のB、5分にわたり0%のBでの再平衡化。1分間の画分を、1mLのディープウェルプレート (Thermoカタログ番号95040450) 中の列ごとの最短経路で0~96分にわたり収集した。高pH RP画分を、15分目から開始して、1つおきのプレートカラムにつき24個の試料に結び付けた (例えば、試料1は、ウェルB10、D10、F10などからの画分を含有していた)。12分から14分の画分が試料1に加えられ、86分後の全ての画分が試料24に加えられ、0分から11分の全ての画分が試料「A」に合わされるように、残りの画分を合わせた。24個の試料の12番目毎の画分のうちの95%を合わせて (1、13; 2、14; ...)、12個のさらなる試料を生成し、これを完全に乾かし、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによるホスホペプチド濃縮の前に -80°C で貯蔵した。

【0228】

固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC)

EDTAでストリッピングしたNi-NTA-アガロースビーズ (Qiagenカタログ番号36113) を使用してIMAC濃縮を実行し、10mMの FeCl_3 溶液中でインキュベートして、 Fe^{3+} -NTA-アガロースビーズを調製した。分画した溶解産物を、80%MeCN中の200 μL の0.1%TFA中に再構成し、100 μL の5%ビーズ懸濁物と共に室温で混合しながら30分インキュベートした。インキュベーションの後、ビーズを、80%MeCN中の300 μL の0.1%TFAで3回洗浄した。リン酸化されたペプチドを、200 μL の70%ACN、1%水酸化アンモニウムを使用して、室温でかき混ぜながら1分にわたりビーズから溶出させた。試料を、60 μL の10%FAを含有する新しいチューブに移し、完全に乾かし、0.1%FA、3%MeCN中に再懸濁した。試料を分析まで -80°C で凍結した。

【0229】

ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析

ホスホペプチド濃縮試料を、陽イオンモードで作動させたLTQ-オービトラップフュージョン質量分析計 (ThermoFisher) にカップリングしたEasy-nLC 1000 (ThermoFisher) でのLC-MS/MSによって分析した。LCシステムは、排気様式で構成されており、社内でReproSil-Pur C18-AQ、3 μm を充填した、石英ガラスナノスプレーニードル (PicoTip (商標) エミッター、50 μm のID $\times$ 20cm、New Objective)、および分析カラムと同じ樹脂を含有するトラップ (IntegraFrit (商標) キャピラリー、100 μm のID $\times$ 2cm、New Objective) からなっており、水中の0.1%FA

(A) および MeCN 中の 0.1% FA (B) の移動相を用いた。ペプチド試料を 20 μ L の 0.1% FA、3% MeCN で希釈し、8.5 μ L をカラム上にローディングし、210 分にわたり、300 nL/分の流量で、2 分にわたり 5 から 7% の B、150 分にわたり 7 から 35% の B、1 分にわたり 35 から 50% の B の勾配、50% の B で 9 分の保持、2 分にわたり 50 から 95% の B、95% の B で 7 分の保持、1 分にわたり 95 から 5% の B、38 分にわたり 5% の B での再平衡化を用いて分離した。2000 V のスプレー電圧をナノスプレーチップに印加した。MS/MS 分析は、解像度 120,000 での 350~1500 m/z からの 1 回のフルスキャン MS からなる 3 秒のサイクル時間にわたり行われ、それに続いて、最も豊富なイオンの 27% 正規化衝突エネルギーでの HCD 活性化を使用したデータ依存型 MS/MS スキャンを行った。選択されたイオンを、1 の繰り返し回数後に 45 秒にわたり動的に排除した。

【0230】

ウェスタンブロッティング

5~13.3 μ g の範囲の等しい質量のタンパク質溶解産物を、4~12% ビスートリス NuPAGE ゲル (ThermoFisher) または 3~8% トリス-アセテート NuPAGE ゲル (ThermoFisher) にローディングした。タンパク質をニトロセルロース膜 (ThermoFisher カタログ番号 LC2001) 上に移した後、膜をウェスタンブロッティング試薬 (Sigma カタログ番号 11921673001) でブロックした。膜を、0.1% Tween (登録商標) が補充された SuperBlock で希釈した一次および二次 mAb で染色した。この研究では、以下の抗体が使用された：抗ヒト CD247 (BD Biosciences カタログ番号 551034)、抗ヒト CD247 pY142 (BD Biosciences カタログ番号 558402)、抗 ZAP-70 pY319 (Cell Signaling カタログ番号 2717S)、抗 SLP-76 pS376 (Cell Signaling カタログ番号 14745S)、抗 PLC-g1 pY783 (Cell Signaling カタログ番号 14008S)、および抗 DAPK1 pY139 (Cell Signaling カタログ番号 13703S)、抗マウス HRP (Cell Signaling カタログ番号 7076S)、および抗ウサギ HRP (Cell Signaling カタログ番号 7074S)。典型的な抗体希釈は 1/10,000 から 1/2,500 の範囲であった。プロットを、CL-Xposure フィルム (ThermoFisher カタログ番号 34091) または ChemiDoc XRS+ システム (Bio-Rad) を使用して展開した。

【0231】

in vitro 機能アッセイ

CAR T 細胞を、K562、K562/CD19、または K562/ROR1 細胞と、2:1 の T 細胞と腫瘍細胞との比率で共培養した。一部の実験において、CAR T 細胞も、対照または抗 STI2 珠子と共に、細胞 100 万個当たり 30 μ L の珠子の比率でインキュベートした。刺激の 24 時間後に、細胞上清中のサイトカイン濃度を、ELISA (ThermoFisher カタログ番号 88-7316-88、88-7025-88、88-7346-88) によって定量化した。細胞内サイトカイン染色のために、アッセイのセットアップ中に GolgiPlug (BD Bioscience カタログ番号 555029) を添加し、細胞を回収し、5 時間の刺激後に染色した。カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル (CFSE) 色素 (ThermoFisher カタログ番号 C34554) の 0.2 μ M 溶液で CAR T 細胞を染色し、CAR T 細胞を、K562/CD19、K562/ROR1 細胞、対照珠子、または抗 STI2 珠子と共に 72 時間インキュベートすることによって、T 細胞増殖を定量化した。

【0232】

RNA シーケンシング (RNA-seq)

RNA を、3 人のドナーからの 24 個の試料から抽出した。全 RNA の完全性を、Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies) を使用してチェックし、Trinean DropSense 96 分分光光度計 (

Caliper Life Sciences) を使用して定量化した。RNA-seq ライブラリーを、TruSeq RNA サンプルプレップキット v2 (Illumina カタログ番号 RS-122-2001) および SciClone NGSx ワークステーション (PerkinElmer) を使用して全 RNA から調製した。ライブラリーサイズ分布を、Agilent 4200 TapeStation を使用して検証した。追加のライブラリーの品質管理、プールされたインデックス付きのライブラリーのブレンド、およびクラスター最適化を、Qubit 2.0 フルオロメーター (ThermoFisher) を使用して実行した。RNA-seq ライブラリーをプールし (6~8 乗の数)、フローセルレーン上にクラスター化した。対合した末端を有する 50 塩基のリード長さ (PE50) のシーケンシング戦略を採用した迅速様式で Illumina HiSeq 2500 を使用して、シーケンシングを実行した。

【0233】

定量 PCR

RNA を抽出し、500 ng を使用して、SuperScript III (ThermoFisher カタログ番号 11752-250) を用いて cDNA を調製した。15 ng の cDNA を、以下の TaqMan アッセイプローブ: Hs00953178__m1 (EPHA4)、Hs00172973__m1 (FOXO4)、Hs00902234__m1 (IL7R)、Hs00360439__g1 (KLF2)、または Hs99999907__m1 (B2M) のうち 1 つと共に反応物に添加した。反応を、1 つの 384-ウェルプレートで、2 連または 3 連で行った。EPHA4、FOXO4、IL7R、および KLF2 プローブからの技術的な 3 連の平均 Ct を、ハウスキーピング遺伝子 β 2 ミクログロブリン (B2M) の平均 Ct で割ることによって、 Δ Ct 値を計算した。CD28/CD3 ζ 、M1、または M3 対 4-1BB/CD3 ζ の比率を各ドナーにつき計算し、 $\log_2$ 変換に供した。

【0234】

NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) マウスモデル

6~8 週齢の雄 NSG マウスに、 5×10^5 個の Raji/fflucl 細胞を尾静脈注射を介して生着させた。1 週間後、PBS または CD19⁺ エプスタイン-バーウイルスリンパ芽球様細胞と共に 9 日間拡大増殖された CD8⁺ および CD4⁺ CAR T 細胞の混合物 (細胞 9×10^5 個) を、静脈内注射した。生物発光イメージングを、Sommermeier et al. (Leukemia 30:492-500 (2016)) に記載されたようにして実行した。個々のマウス間の差が予測される実験のために、データ分析につき実験群当たり少なくとも 5 匹のマウスを使用して、81% の検出力を提供して、片側 0.05 レベルの有意性を用いた t 検定に基づき 1.75 の効果量を検出した。マウスの取扱者を、群の割り当てに対して盲検化した。処置群は以下の通りであった: PBS/Sham (n=6 匹のマウス); 4-1BB/CD3 ζ CAR T 細胞 (n=15 匹のマウス); CD28/CD3 ζ CAR T 細胞 (n=15 匹のマウス); CD28/CD3 ζ Y1 CAR T 細胞 (n=15 匹のマウス); CD28/CD3 ζ Y3 CAR T 細胞 (n=15 匹のマウス)。

【0235】

ショットガン質量分析データ分析

各反復実験からの生 MS/MS スペクトルを、MaxQuant/Andromeda サーチエンジンバージョン 1.6.0.1 (Cox et al., Nat. Biotechnol. 26:1367-1372 (2008)) を使用して、一般的な実験汚染物質を用いた再調査したヒト Universal Protein Resource (UniProt) 配列データベース (リリース 2016_01) に対して一緒にサーチした。サーチは、最大 2 つの誤った切断についてトリプシン酵素の制約を用いて実行された。可変の改変は、酸化されたメチオニン、リン酸化されたセリン、リン酸化されたスレオニン、およびリン酸化されたチロシンであった。カルバミドメチル化されたシステインを静的な改変として設定した。ペプチド MH+ 質量許容差を 20 ppm に設定した。全

体的なFDRを、リバーズデータベースターゲットデコイアプローチを使用して $\leq 1\%$ に設定した。

【0236】

3つのTMT実験のために、ホスホペプチド部位の局在化を、MaxQuantによって決定し、Perseusバージョン1.6.0.7 (Tyanova et al., Nat. Methods 13:731-740 (2016))を使用してリン酸化部位に変換した。この工程において、逆のヒットおよび存在し得る汚染物質を、さらなる分析から排除した。各TMTチャンネルをチャンネル中央値に拡張し、続いて $\log_2$ 変換することによって、データ正規化を実行した。刺激されたチャンネルから適切な対照チャンネルを引くことによって、刺激対対照の比率を計算した。不十分なMSサンプリングにより、一部のリン酸化部位（特徴）はわずか1または2回の反復実験で見出されたに過ぎず、より一層少数($< 1\%$)の部位は、どのTMTチャンネルにも見出されなかった。

【0237】

limma統計フレームワークおよび関連するRパッケージを使用して、PO₄部位に対する差次的な発現分析を実行した (G. K. Smyth, Stat Appl Genet Mol Biol 3:Article 3 (2004); Ritchie et al., Nucleic Acids Res. 43:e47 (2015))。これらの分析のために、少なくとも2つの実験および全てのTMTチャンネルで価値のある特徴のみを維持し、14,490個の定量化したリン酸化部位を残した。線形モデルを各PO₄部位にフィッティングし、実験バイズの調整t統計量を使用して、発現／存在度における差を評価した。刺激対対照処置を比較する対比を試験した。ROR1特異的およびCD19特異的CARが2人のドナーにわたり類似の表現型を示し、リガンドとは無関係に同じように刺激されたと仮定すれば (図1D~1F)、対応する測定は、複製とみなされた。同じ患者および同じ抗原に由来する測定値を考慮に入れるためにlimmaパッケージの複製の相関関数を使用して、級内相関を推測した (Smyth et al., Bioinformatics 21:2067-2075 (2005))。0.7の絶対 $\log_2$ 変化倍率カットオフ (刺激対対照) および5%の偽発見率 (FDR) カットオフを使用して、差次的に発現されるPO₄部位を決定した。StringDBを使用してシグナル伝達ネットワークおよびKEGG経路の分析を実行した。

【0238】

RNAシーケンシングデータ分析

画像分析および塩基コーリングを、Illuminaのリアルタイム分析v1.18ソフトウェア、続いてインデックス付きのリードの「デマルチプレキシング」を使用して実行し、FASTQファイルの作成をIlluminaのbcl2fastq変換ソフトウェアv1.8.4を使用して実行した。RNA-seqデータを、STARを使用してヒトゲノム (UCSCヒトゲノムアセンブリGRCh38参照) にアライメントし、遺伝子定量化を、RSEMを使用して実行した (Dobin et al., Bioinformatics 29:15-21 (2013); Li & Dewey, BMC Bioinformatics 12:323 (2011))。非ゼロのリード計数が10未満の遺伝子 (技術的な反復を考慮に入れる) を捨て、18,498個の発現された遺伝子を残した。全てのライブラリーが品質管理基準 (200,000個より多くのリード、12,000個の検出された遺伝子およびエクソン範囲 $> 60\%$ を有するライブラリー) を合格した。生の計数データをRにインポートした。edgeRを使用して正規化係数を計算して、生のライブラリーサイズを測り、続いてlimma Bioconductorパッケージからのvoom変換を行った (Robinson & Oshlack, Genome Biol. 11:R25 (2010); Law et al., Genome Biol. 15:R29 (2014))。これは、計数データを100万当たりの $\log_2$ 計数に変換し、適切な観察レベルの重量を計算するための平均分散関係を推測する。ショットガン質量分析データ分析において上述したように、差次的な遺伝子発現分析のために対象のランダム効果を用いた線形モデルを再び使用した。

処置（対照対刺激）またはCAR（CD28／CD3ζ対4-1BB／CD3ζ）を比較する対比を試験した。1の絶対log₂変化倍率カットオフおよび1%のFDRカットオフを使用して、差次的に発現される遺伝子を決定した。

【0239】

（実施例2）

CARシグナル伝達の分析のための臨床的に関連性のある初代T細胞モデル

TCRシグナル伝達は、抗CD3モノクローナル抗体（mAb）で刺激された形質転換したJurkat T細胞のLC-MS/MS分析を使用して研究されてきた（Mayya et al., Sci Signal 2:ra46-ra46 (2009); Nguyen et al., Mol. Cell Proteomics 8:2418-2431 (2009); Salek et al., PLoS ONE 8:e77423 (2013)）。Jurkat細胞は、一般的な分子生物学の技術を使用して容易に成長および操作できることから、シグナル伝達研究のために選択した。シグナル伝達を分析するためにCARをJurkat細胞に導入することが考えられたが、抗CD3mAb刺激後のLC-MS/MSによる公知の近位TCRシグナル伝達分子のPO₄の比較から、不死化Jurkatおよび培養された初代ヒトT細胞が、タンパク質PO₄の別個のパターンを呈示したことが解明された（図8A～8B）。不死化Jurkat細胞とは対照的に、初代T細胞は、刺激の後に、CD3鎖およびZAP-70の長期化したPO₄、ならびに差次的にリン酸化されたCD28、LAT、LCK、PAK2、SHP1、SOS1、およびVAV1を示した。したがって、初代ヒトT細胞でCARシグナル伝達を研究して、臨床的に関連性のあるデータを得た。

【0240】

（実施例3）

CARシグナル伝達の分析のためのタグを有するCARの設計

CAR抗原を発現する腫瘍細胞は、LC-MS/MSのために初代CAR T細胞を刺激するのに使用できるが、このアプローチは、同位体標識したアミノ酸（SILAC）と共に腫瘍細胞およびT細胞両方を長期培養して、ホスホペプチドを各細胞型から区別できるようにすることを必要とする。腫瘍細胞はまた、シグナル伝達タンパク質のリン酸化に寄与するT細胞上のアクセサリ分子とも係合することができる。これらの細胞ベースの刺激の欠点を回避するために、CARシグナル伝達を活性化するための無細胞方法が開発された（図1A～1B）。スパーサー領域中にCD28／CD3ζまたは4-1BB／CD3ζシグナル伝達ドメインのいずれかおよび9アミノ酸のStreptag II（STII；配列番号10）配列を含有するCD19特異的およびROR1特異的CARをコードするレンチウイルスベクターを設計した（配列番号19、21、23、および25）（図1A）。全ての構築物は、CARを発現するT細胞の精製のために、T2Aエレメントの下流にトランケート型EGFR（EGFRt）形質導入マーカーを含有していた（Wang et al., Blood 118:1255-1263 (2011)）。これまでに、STII配列の包含は、CAR T細胞の認識にも機能にも干渉しないこと、およびSTII CD28／CD3ζまたは4-1BB／CD3ζ CAR T細胞は、抗STII mAbとのシミュレーションによってin vitroで効率的に活性化および拡大増殖させることができることが示された（Liu et al., Nat. Biotechnol. 34, 430-434 (2016)）。

【0241】

初代CD8⁺T細胞を4つのレンチウイルスベクターのそれぞれで形質導入し、EGFRt⁺発現に関して選別し、単回サイクルの刺激を用いて、それに続く分析のために1.6×10⁸個を超える細胞に拡大増殖させた（図1C）。各scFv特異性のCD28／CD3ζおよび4-1BB／CD3ζ CARが、細胞表面上における類似のレベルで存在した（図1D）。CAR T細胞は、類似のレベルのCD45RO、CD62L、CD27、およびCD28も発現したが（図1E）、よりわずかに大きい頻度のCD19 4-1BB／CD3ζ CAR T細胞がCD62Lを発現した。PD-1およびTim3

はいずれのCAR T細胞集団によっても発現されず、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の85%超がG₀/G₁細胞周期相であったが、これは、有意な持続的なシグナル伝達の欠如と一致する（図1E～1F）。

【0242】

MS分析のための溶解産物を調製する前に、STIIライゲーションにより誘導された基準のT細胞シグナル伝達事象を評価した。ROR1特異的4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を、様々な量の抗STII mAbでコーティングされたマイクロビーズと共に45分インキュベートし、ウェスタンブロットによってCD3ζ、Y142、SLP-76、Y376、およびPLC-γ1、Y783を測定した。比較のために、CAR T細胞を、ROR1が形質導入されたK562（K562/ROR1）腫瘍細胞で刺激した。最大のビーズ対細胞の比率のときに、抗STIIビーズ刺激は、CD3ζ、SLP-76、およびPLC-γ1のPO₄を、K562/ROR1細胞で刺激されたCAR T細胞からの溶解産物で観察されたレベルと類似のレベルに増加させ、このビーズ対細胞の比率を全てのそれに続く実験に使用した（図1G）。またこれらの基質のPO₄は、K562/CD19または抗STII mAbでコーティングされたビーズで刺激されたCD19 CAR T細胞においても類似していた。したがって、抗STII mAbでコーティングされたビーズは、初代T細胞においてCARシグナル伝達を選択的に活性化するための正確な方法を提供する。

【0243】

（実施例4）

別個の共刺激ドメインを有するCARを含有するT細胞におけるタンパク質リン酸化の分析

CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞を、抗STII mAbでコーティングされた、またはコーティングされていない（対照）磁気ビーズと共に10または45分インキュベートして、CAR刺激によって開始させた初期および後期のPO₄事象を捕獲した3つの独立した実験を実行した（図2A）。2人の異なるドナーから生成したCD19特異的CAR T細胞を2つの実験で使用し、第3の実験は、2人のドナーのうち1人から得たROR1特異的CAR T細胞を利用した（図2B）。各実験中のホスホペプチドの相対的な定量化を提供するために、各トリプシン消化溶解産物を固相等重タンデム質量タグ（TMT）で標識し、抗ホスホチロシン免疫沈降、それに続く残りの溶出液の固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによって、ホスホペプチドに関して濃縮した（Thompson et al., Anal. Chem. 75:1895-1904 (2003)）（図9）。

【0244】

これらの技術を使用して、合計26,804個のPO₄部位を、4,849個の遺伝子産物に相当する3つの実験にわたり検出した。PO₄部位のうち、571個（2.13%）がホスホチロシンであり、4,647個（17.33%）がホスホスレオニンであり、21,586個（80.53%）がホスホセリンであった（図2C）。反復実験間で、捕獲されたホスホプロテオームにおいて顕著なオーバーラップがあった（図2D）。各実験で検出されたPO₄部位の99%が、刺激されていない、および刺激されたT細胞溶解産物の両方に存在していたことから、CAR活性化により誘導された変化の定量化が可能になった（Navarro et al., Nat. Immunol. 12:352-361 (2011); van Oers et al., Mol Cell Biol 13:5771-5780 (1993)）。

【0245】

（実施例5）

CARは基準のT細胞シグナル伝達中間体のリン酸化を変更する

まず、よく説明されたTCR刺激によって誘導されたPO₄事象をMSデータセット内で分析して、これらの部位もCAR刺激応答性であるかどうかを決定した（Brownlie and Zamoyiska, Nature Reviews Immunolo

g y 13:257-269 (2013))。刺激された試料を適切な対照と比較すること(すなわちCD28/CD3ζ CARの10分の刺激 対 CD28/CD3ζ CARの10分の対照)によって、各反復実験でlog₂変化倍率(log₂FC)値を各PO₄部位につき計算した。10分で、Y83、Y111、およびY142におけるCD3ζのPO₄増加、加えてY493におけるZAP-70のPO₄増加が、刺激されたCAR T細胞で見出された(図2E)。留意すべきことに、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の両方が、Y206およびY209におけるCD28のPO₄増加を示したことから、4-1BB/CD3ζ CARのライゲーションは内因性CD28のPO₄をもたらしたことが実証される。45分の刺激後、S1248におけるPLC-γ1およびS138におけるBCL10のPO₄増加を含み、PO₄が下流TCRシグナル伝達ノードに拡がったことが観察された(図2F)(Rueda et al., J Immunol 178:4373-4384 (2007); Ishiguro et al., Mol Immunol 44:2095-2100 (2007)も参照)。これらの公知の部位の大部分に関して、CD28/CD3ζ CARの刺激は、10および45分の両方で4-1BB/CD3ζ CARより大きい規模のlog₂FCを開始させた。抗CD3刺激の後にT細胞においてリン酸化されることが公知であるCD3δ、ε、またはγ ITAMのPO₄における再現可能な変化は、いずれの時点でも観察されなかった。

【0246】

MSデータセットにおいてCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の間で観察された規模で差の一部を検証するために、細胞溶解産物を、ウェスタンブロットによって、3つのCAR活性化によって誘導されたリンタンパク質シグナル伝達事象、すなわちCD3ζ pY142; ZAP-70 pY319; およびPLC-γ1 pY783に関して評価した。図2Gで示されるように、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激は、CAR CD3ζドメイン、ZAP-70およびPLC-γ1のPO₄を増加させた。MSデータと一致して、これらのタンパク質のより強いPO₄が、刺激されたCD28/CD3ζ CAR T細胞で観察された。留意すべきことに、低レベルの基底のCAR CD3ζ PO₄が、いずれかの特異性を有する4-1BB/CD3ζ CAR T細胞中に存在していなかった、刺激されていないCD28/CD3ζ CD19およびROR1 CAR T細胞で検出された。構成的CAR CD3ζドメインPO₄が数々のCARに関して記載されており、有害なT細胞表現型およびT細胞消耗マーカーの上方調節に関連付けることができる(Frigault et al., Cancer Immunol Res 3:356-367 (2015); Long et al., Nature Medicine 21:581-590 (2015)を参照)。しかしながら、刺激されていないCD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞における細胞周期またはPD-1もしくはTim3の発現の差は観察されなかった(図1E~1F)。したがって、刺激されていないCD28/CD3ζ CAR T細胞で検出された低レベルの基底PO₄は、異なるscFv特異性を有する一部のCARで観察されたより極端な持続的なシグナル伝達と異なっていた。

【0247】

(実施例6)

別個の共刺激ドメインを有するCAR T細胞の活性化は、異なる動態および規模で類似のタンパク質リン酸化事象を誘導する

ショットガンMSの利点は、公知の実験的に検証された抗体がない何千ものPO₄事象を定量的に測定することである。Limma統計フレームワークおよび関連のRパッケージを使用して、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARライゲーションの後にモジュレートされたPO₄部位を同定した(G. K. Smyth, Stat Appl Genet Mol Biol 3:Article3 (2004))。PO₄部位は、3つの実験のうち少なくとも2つで検出され、10または45分において

10

20

30

40

50

、刺激された条件と刺激されていない条件との間で平均 $|\log_2 FC| \geq 0.7$ を示し、5%のFDRカットオフを満たした場合、それはCAR刺激応答性であると同定した。0.7の $\log_2 FC$ カットオフが、 $\log_2 FC$ 値の分布のおよそ2標準偏差を表すため選択された(図10)。

【0248】

これらの厳格なカットオフを使用して、CD28/CD3ζ CAR T細胞における22個のタンパク質からの26個のPO₄部位を、10分の時点において刺激応答性として同定した。これらの差次的にリン酸化されたタンパク質を、KEGG TCRシグナル伝達経路のメンバーにつき濃縮したところ、S64におけるp21活性化キナーゼ2(PAK2)、S231におけるCD8アルファ(CD8A)、S370におけるプロテインキナーゼCθ(PKCT)、ならびにS748およびT749における癌原遺伝子vav(VAV1)の増加したPO₄を含んでいた(図3Aおよび表1A~1B)。対照的に、10分の時点で $\log_2 FC$ およびFDR基準を満たした4-1BB/CD3ζ CAR T細胞からの部位はなかった(図3B)。74個のPO₄部位が $\log_2 FC$ カットオフを満たしたが、FDRカットオフを満たさず、これらのなかでも、S4903における神経芽細胞分化関連タンパク質(AHNK)、およびS315およびS319におけるカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII型サブユニットデルタ(CAMK2D)のPO₄増加が検出されたが、これは、モジュレートされたCa²⁺シグナル伝達を示す(表1A~1B)。4-1BB/CD3ζ CARにより誘導された早期のタンパク質PO₄におけるロバストな変更の欠如は予想外であったが、10分においてCAR CD3ζおよびPLC-γ1の最小のPO₄を示すウェスタンブロットデータと一致する(図2G)。

【0249】

45分の刺激の後、より強いタンパク質PO₄が生じ、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR試料のいずれかからの1,289個のPO₄部位が $\log_2 FC$ およびFDRカットオフを満たした。これらは、CD28/CD3ζ CAR T細胞における743個の遺伝子産物からの1,279個のPO₄部位、および4-1BB/CD3ζ CAR T細胞における346個の遺伝子産物からの522個の部位を含んでいた(図3C~3D)。したがって、CD28/CD3ζ CARの刺激が続くことにより、より多数のPO₄部位の変更がもたらされた。しかしながら、印象的なことに、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR刺激によってほぼ全ての部位が類似の様式でモジュレートされた刺激応答性PO₄部位間の強い相関が観察された(図3E)。CD28/CD3ζ CAR試料におけるカットオフを満たした1,289個の部位の12個(0.93%)のみが4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって差次的にモジュレートされ、43個の(3.3%)部位のみが4-1BB/CD3ζ CAR刺激の後により大きい規模の $\log_2 FC$ を呈示したが、これは、CD28/CD3ζ CARの下流においてより強いシグナル伝達を示唆する先行のデータと一致している(図3E)。さらに、これらの12および43個の部位のサブセットは、現在のところ定義された4-1BBシグナル伝達ネットワークにマッピングされなかった。

【0250】

CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARの刺激後におけるタンパク質PO₄事象にほとんど差がないという発見は予想外であり、基準のT細胞共刺激シグナル伝達経路に参与するタンパク質がどの程度影響を受けたかという課題を引き出した。4-1BB/CD3ζ CARが内因性CD28を活性化したという初期の発見と一致して、CD28シグナル伝達中間体VAV1、PKCT、およびPIK3C2Aは、CARのいずれかの刺激の後にPO₄増加を示した(図3F)(Acuto and Michel, Nature Reviews Immunology 3:939-951 (2003))。4-1BBシグナル伝達経路内において、4-1BBおよびTRAF2シグナル伝達の直接の標的であるLSP1は、両方のCARによってモジュレートされた(Sabbagh et al., J. Leukoc. Biol. 93:713-7

10

20

30

40

50

2 1 (2 0 1 3))。これらの類似性にもかかわらず、CD 2 8 / CD 3 ζ CAR は、4 - 1 B B シグナル伝達経路におけるものを各 P O₄ 部位を、4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR より大きい規模でモジュレートした。したがって、分岐シグナル伝達ネットワークを活性化するのではなく、受容体中の別個の共刺激ドメインから予測され得るように、CD 2 8 / CD 3 ζ および 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR のライゲーシオンは、基準の CD 2 8 および 4 - 1 B B シグナル伝達中間体の両方を包含する細胞内タンパク質 P O₄ において、高度に類似した変化を誘導した。

【0 2 5 1】

CD 2 8 / CD 3 ζ および 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 刺激によって影響を受ける主要な経路および個々のタンパク質リン酸化事象を例示するマップは、基準の T C R シグナル伝達およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (M A P K) シグナル伝達経路に 10
関与するタンパク質を含む (図 4 および表 1 A)。

【0 2 5 2】

(実施例 7)

CAR ライゲーシオン後に持続する CAR シグナル伝達の規模の差

CD 2 8 / CD 3 ζ および 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 刺激によって媒介されるタンパク質 P O₄ は高度に類似していたが、P O₄ 部位の大部分において強度の点で異なっていた。CAR 刺激後にタンパク質 P O₄ における変化を定量化することは、CAR シグナル強度の全体論的な尺度を提供できることは理にかなっていた。CD 2 8 / CD 3 ζ およ 20
び 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 試料からの 4 5 分における刺激応答性 P O₄ 部位を、1 0 g₂ F C を減少させることによって配置した。両方の CAR が類似の様式でタンパク質 P O₄ をモジュレートしたことを示す先行の結果と一致して、刺激の後に 2 0 種の最もリン酸化された部位のうち 1 5 種が、CD 2 8 / CD 3 ζ および 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR T 細胞間で共通していた (表 2 A ~ 2 B)。しかしながら、上位 2 0 個の部位の P O₄ は、CD 2 8 / CD 3 ζ CAR 試料において平均して 1 1 . 1 5 倍増加したが、4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 試料では平均してわずか 5 . 8 倍であった (図 5 A)。CAR 刺激応答性 P O₄ 部位をシグナル伝達経路によって階層化することにより、K E G G T C R シグナル伝達経路内の平均 P O₄ 部位が、CD 2 8 / CD 3 ζ CAR 試料において 2 . 5 2 倍モジュレートされたが、4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 試料ではわずか 1 . 6 9 倍であったことがさらに示された (図 5 B)。 30

【0 2 5 3】

4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR シグナルが、後の時間で CD 2 8 / CD 3 ζ CAR のものに類似した強度に達したかどうかを決定するために、CAR T 細胞を、6 0、1 2 0、または 1 8 0 分刺激し、基準の、および新たに同定されたシグナル伝達中間体の P O₄ をウェスタンブロットによって測定した。図 5 C で示されるように、CD 2 8 / CD 3 ζ CAR 刺激は、全ての試料において S L P - 7 6、P L C - γ 1、および D A P P 1 のより強い P O₄ をもたらしたことから、この時間枠中に、4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR 刺激は決して CD 2 8 / CD 3 ζ CAR シグナル強度に匹敵しないことが示される。

【0 2 5 4】

(実施例 8)

CAR シグナル強度はエフェクター細胞様表現型と正に相関し、i n v i v o の抗腫瘍活性を低減した 40

T 細胞の活性化およびシグナル伝達の強度は、エフェクター細胞の分化およびメモリー形成を調節する転写の差をもたらす (K a e c h a n d C u i, N a t u r e R e v i e w s I m m u n o l o g y 1 2 : 7 4 9 - 7 6 1 (2 0 1 2))。RNA - S e q を使用して、6 時間の S T I I ビーズ刺激後における CD 2 8 / CD 3 ζ または 4 - 1 B B / CD 3 ζ CAR T 細胞における転写プログラムを分析し、| l o g₂ F C | > 1 . 0 および F D R < 1 % を満たす差次的に発現される遺伝子を同定した。より速く、より強いリンタンパク質シグナルと一致して、CD 2 8 / CD 3 ζ CAR 刺激は、より著しく早期の転写変化を開始させた。l i m m a を使用して、刺激された CD 2 8 / 50

CD3ζ CAR-T細胞と、刺激されていないCD28/CD3ζ CAR-T細胞との比較は、4,894個の差次的に発現される遺伝子を同定し、それに対して、4-1BB/CD3ζ CAR刺激は、197個の差次的に発現される遺伝子をもたらした。T細胞活性化マーカーCD69は、CD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR刺激によって類似の程度に上方調節されたが(図6A)、エフェクター分子であるグランザイムB(GZMB)、インターフェロンγ(IFNG)、インターロイキン-2(IL2)、腫瘍壊死因子α(TNF)、インターロイキン-6(IL6)、マクロファージ炎症性タンパク質1α(CCL3)、およびマクロファージ炎症性タンパク質1β(CCL4)の発現における、4-1BB/CD3ζ CAR T細胞と比較してより大きい倍率の増加が、活性化されたCD28/CD3ζ CAR T細胞で観察された(図6B)。

【0255】

刺激されたCD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ試料の直接の比較は、1,673個の差次的に発現される遺伝子を同定した(表3)。これらのなかでも、クルッペル様因子2(KLF2)、インターロイキン-7受容体(IL7R)、およびRhoファミリー相互作用細胞極性化レギュレーター2(RIPOR2、以前はFAM65Bとして公知)が、CD28/CD3ζ CAR T細胞試料においてより低いレベルで発現された(図6C)。KLF2およびIL7Rは、メモリーT細胞形成と関連し、転写因子のFOXOファミリーの標的である(Rougerie et al., J Immunol 190:748-755 (2013); Kaech et al., Nat Immunol 4:1191-1198 (2003); Kerdiles et al., Nat Immunol 10:176-184 (2009))。これらの線に沿って、FOXO4発現は、刺激されたCD28/CD3ζ CAR T細胞において低減された。qPCRによって、これらの発現の差が確認され、これらのT細胞メモリー関連遺伝子は、刺激されていないCD28/CD3ζまたは4-1BB/CD3ζ CAR T細胞において差次的に発現されなかったことが示された(図6D)。したがって、CD28/CD3ζ CAR活性化は、エフェクター分子の発現の増加およびFOXOファミリー遺伝子標的の喪失を特徴とする転写プロファイルを優先的に誘導した。

【0256】

TCRシグナル伝達のように、CD28/CD3ζと4-1BB/CD3ζ CARとの間のシグナル量の差は、T細胞の機能に影響を与えるという仮説が立てられた。これを試験するために、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞をCAR抗原を発現するK562細胞またはSTIBeezで活性化し、様々な時点でサイトカイン生産および増殖を測定した。5時間後、より大きい比率のCD28/CD3ζ CAR T細胞が、IFN-γ、IL-2、およびTNF-αを生産し(図6E)、24時間後、CD28/CD3ζ CAR T細胞は、4-1BB/CD3ζ CAR T細胞より著しく多くのIFN-γ、IL-2、およびTNF-αを分泌した(図6F)。72時間後、4-1BB/CD3ζ CAR T細胞より多くの数のCD28/CD3ζ CAR T細胞が分裂し、それより多くの回数の分裂を経た(図6G)。

【0257】

優れたin vitroエフェクター機能にもかかわらず、CD28/CD3ζ CAR T細胞は、in vivoにおける腫瘍制御においてそれほど有効ではないことが証明された。確立されたCD19⁺Rajiリンパ腫異種移植片を有するNOD/SCID/γc^{-/-}(NSG)マウスに3×10⁶個のCAR T細胞が養子導入したところ、CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の両方が、完全な腫瘍退縮を媒介した(図6H)。しかしながら、低減された(7.5~8×10⁵個の)細胞の用量の輸注は、CD28/CD3ζ CAR T細胞が、4-1BB/CD3ζ CAR T細胞よりはるかに有効性が低く、40日以内に全てのCD28/CD3ζ CAR T細胞で処置したマウスが腫瘍進行のために死亡したことを示した。腫瘍の影響を受けた骨髄において、より高い頻度にCAR T細胞が蓄積されたにもかかわらず、より少な

いCD28/CD3ζ CAR T細胞用量で処置したマウスにおいて腫瘍進行が起こった(図6I)。消耗した表現型の獲得と一致して、骨髄におけるCD28/CD3ζ CAR T細胞は、より高いレベルのPD-1、Lag-3、およびTim-3を発現した(図6J)。総合すると、これらのデータは、CD28/CD3ζ CAR活性化によって媒介される迅速で強いシグナル伝達が、*in vitro*におけるサイトカイン生産およびT細胞増殖の増加にもかかわらず、T細胞表現型の消耗と低減した抗腫瘍活性をもたらしたことを示す。

【0258】

(実施例9)

CD28/CD3ζおよび4-1BB/CD3ζ CARは内因性CD28およびLcKと差次的に会合する

CD28/CD3ζ CARシグナル伝達の動態および強度の増加の可能性のある原因を調べるために、CD8⁺T細胞からCAR複合体を免疫沈降し、基底状態における関連するT細胞シグナル伝達タンパク質間の差を探索した。ウェスタンブロットによって、効率的なCARのプルダウンが確認され、内因性CD28およびLcKとCD28/CD3ζ CARとの会合が示されたが、最小限のCD28およびLcKと4-1BB/CD3ζ CARとの会合しか示されなかった(図7A)。45分のCAR刺激後における活性化された4-1BB/CD3ζ CAR T細胞からの免疫沈降でも、内因性CD28を検出できなかった(図7B)。基底のCARリン酸化はCD28共刺激ドメインの存在によって付与され、CAR刺激後にY206、Y209、およびY218は強くリン酸化されたため(MSデータ)、これらの残基においてチロシンからフェニルアラニンへの変異を有するCD28/CD3ζ CARを構築した(図7B)。Y218F置換を有するCD19特異的CARとY206F、Y209F、およびY218F置換を有するCD19 CARとは、それぞれ配列番号27および29に記載のアミノ酸配列を含む。Y218F置換を有するROR1特異的CARとY206F、Y209F、およびY218F置換を有するROR1 CARとは、それぞれ配列番号31および33に記載のアミノ酸配列を含む。

【0259】

1つ(Y1)または3つ全てのチロシン(Y3)に変異を有するCD19およびROR1特異的CARは、T細胞において効率的に発現され、*in vitro*では、ROR1⁺またはCD19⁺腫瘍細胞との共培養に応答して、増殖し、インターフェロンガンマ(IFN-γ)を生産することによって機能化された(図7C~7D)。留意すべきことに、IL-2およびTNF-αの分泌は、チロシン変異によって段階的に低減した。免疫沈降により、内因性CD28はY3 CARと会合しなかったにもかかわらず、LcK会合はY1およびY3変異によって消失しなかったことが示された(図7F)。基底のCAR

CD3ζ PO₄の部分的な(Y1)または完全な(Y3)消失は、変異体CARで観察されたが(図7G)、Y1およびY3 CARはそれでもなお、STIIBez刺激の後、野生型CD28/CD3ζ CARと類似した動態および強度でSLP-76およびPLC-γ1をリン酸化した(図7G)。Y1およびY3シグナル強度の増加を示すウェスタンブロットデータと一致して、Y1またはY3 CAR T細胞で処置されたマウスは、野生型CD28/CD3ζ CAR T細胞で処置されたマウスに類似した生存中央値と、4-1BB/CD3ζ CAR T細胞の生存中央値より短い生存中央値を示した(図7H)。まとめると、これらの結果から、基底のCAR CD3ζリン酸化も内因性CD28の会合も、CD28/CD3ζ CARのシグナル動態および強度の増加に関与していなかったことが示唆された。

【0260】

構成的LcK活性化は、T細胞エフェクター機能を促進する(Tavano et al., J Immunol 173:5392-5397 (2004))。LcKのCD28/CD3ζ CARとの会合が、CAR活性化後にシグナル伝達中間体の迅速でロバストなリン酸化を媒介するかどうかを検査するために、CD28のLcK結合部位に

10

20

30

40

50

においてプロリンからアラニンへの変異を生成した（図11A）。野生型および変異体CD28/CD3ζ CARの免疫沈降により、プロリンからアラニンへの変異を有するCARにおいてLck会合は存在しなかったことが示された（図11B）。シグナル伝達分析から、CD28P CAR中の単独のプロリン残基の変異は、基底のCAR CD3ζリン酸化を部分的に消失させたが、シグナル強度を低減させなかったことが実証された（図11C）。対照的に、Y3P CARにおけるプロリンおよびチロシン残基の同時の変異は、基底のCARリン酸化を十分に消失させ、刺激の後におけるSLP-76およびPLC-γ1のリン酸化の規模を低減させた。留意すべきことに、IFN-γ、IL-2およびTNF-αの分泌は、サイトカイン生産の全体的なレベルが4-1BB/CD3ζ CAR T細胞に類似するようなプロリンからアラニンへの変異によって低減された（図11D）。これらのデータは、CD28/CD3ζ CARと4-1BB/CD3ζ CARとの間のCARシグナル強度における差が、より大きいLckのCD28/CD3ζ CARとの会合に部分的に関連することを示す。さらに、CARシグナル強度および炎症促進性サイトカイン生産は、CD28シグナル伝達ドメインにおけるチロシンおよびプロリン残基を変異させることによって変更することができる。

【0261】

（実施例10）

改変されたCD28-CAR T細胞を使用したがんの処置

自己T細胞を、固形または血液がんを有する患者のPBMCから単離し、選別して、エフェクターおよびヘルパーT細胞を単離する。T細胞画分を、抗CD3/抗CD28ビーズおよびIL-2と共に培養し、ex vivoにおいて、目的の腫瘍抗原に特異的なscFv、スパーサー、膜貫通ドメイン、Y206F、Y209F、およびY218F置換を含む改変されたCD28共刺激ドメイン、ならびに細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードするレンチウイルス構築物で形質導入する。この構築物は、形質導入のための細胞表面マーカーもコードする。形質導入されたT細胞を、in vitroで、抗原を発現する腫瘍細胞での刺激に応答する機能性（増殖、サイトカイン放出）に関して検査する。その後、CAR T細胞をin vitroで拡大増殖させる。

【0262】

患者に、リンパ球枯渇化学療法を施し、その後、臨床的に関連性のある用量のCAR T細胞を静脈内輸注を介して投与する。CAR T細胞は、養子移入後に患者中で拡大増殖し、フローサイトメトリーおよびベクター配列のq-PCRによって測定される。in vivoの拡大増殖のピークにおいて試料を処置した患者から採取して、表現型を測定し、機能を評価し、抗腫瘍性の持続を決定する。フローサイトメトリーおよび遺伝子発現プロファイリングを実行して、細胞における遺伝子発現を特徴付ける。腫瘍サイズ、数、および分布の低減をMRIによってモニターする。

【0263】

上述した様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。2018年2月26日に出願された米国仮特許出願第62/635,450号、2018年5月24日に提出された米国仮特許出願第62/676,787号、および2018年10月1日に提出された米国仮特許出願第62/739,792号を含む、本明細書で参照および／または出願データシート中に列挙された、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および特許以外の刊行物の全ては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。よりさらなる実施形態を提供するために、実施形態の態様は、様々な特許、出願および公報の概念が採用されるように必要に応じて改変することができる。

【0264】

上記の詳細な説明の観点から、これらおよび他の変化が実施形態になされてもよい。一般的に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、明細書および特許請求の範囲に開示された具体的な実施形態に特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきではない

が、このような特許請求の範囲の権利が及ぶ均等物の全範囲と共に、あらゆる可能な実施形態を含むと解釈されるものとする。したがって、特許請求の範囲は本開示によって限定されない。

【 0 2 6 5 】

表

【表 1 - 1】

表 1A: CD28/CD3z CAR 試料で同定された 26 種の CAR 刺激応答性 PO4 部位

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2F C	FDR	遺伝 子	UniPro t ID	アミノ 酸	位置	多重度	配列ウィン ドウ
Q8IZP0- 2_S226_1	ABI1_S2 31	0.718	0.016	ABI1	Q8IZP 0-2	S	226	_1	SPARLGSOH SPGRTASLN QRPRTHSGS SGGS (配列 番号 76)
Q9P2A4- 2_S164_1	ABI3_S1 70	0.847	0.007	ABI3	Q9P2A 4-2	S	164	_1	DLSTQLSRT GTLRSKSIK APATPASAT LGRP (配列 番号 77)
Q09666_S 5857_1	AHNAK_ S5857	1.517	0.006	AHNA K	Q0966 6	S	5857	_1	DDETGKLQ GSGVSLASK KSRLSSSS NDSGN (配 列番号 78)
Q01433_S 100_1	AMPD2_ S100	1.035	0.014	AMPD 2	Q0143 3	S	100	_1	EARGGLGA PPLQARS PGPAPCLKH FPLDL (配列 番号 79)
P51681_S 337_1	CCR5_S3 37	0.968	0.007	CCR5	P51681	S	337	_1	KCCSIFQQE APERASSVY TRSTGEQEIS VGL (配列番 号 80)
P01732- 2_S194_1	CD8A_S2 31	1.341	0.013	CD8A	P01732 -2	S	194	_1	KCPRPVVK GDKPSLSAR YV (配列番 号 81)
Q96BY6- 3_S13_1	DOCK10 _NA	0.997	0.004	DOCK 10	Q96BY 6-3	S	13	_1	MSFRGK VFKREPSEF WKKRRIVR RVNQE (配 列番号 82)
Q92608_S 1791_2	DOCK2_ S1791	1.207	0.004	DOCK 2	Q9260 8	S	1791	_2	EANTSPRLS QTFLQLSDG DKKTLTRK KVNQF (配 列番号 83)
Q92608_ T1786_2	DOCK2_ T1786	1.207	0.004	DOCK 2	Q9260 8	T	1786	_2	IPGLDEANT SPRLSQTL QLSDGDKK TLTRK (配列 番号 84)
P11171- 2_S84_1	EPB41_S 84	0.910	0.017	EPB41	P11171 -2	S	84	_1	NKERTSESR GLSRLFSSFL KRPKSQVSE EEG (配列番 号 85)
P11171- 2_S85_1	EPB41_S 85	0.990	0.017	EPB41	P11171 -2	S	85	_1	KERTSESRG LSRLFSSFLK RPKSQVSEE EGK (配列番 号 86)
Q9Y624_ S284_1	F11R_S2 84	0.908	0.016	F11R	Q9Y62 4	S	284	_1	TKKGTSSKK VTYSQPSAR SEGEFKQTS SFLV (配列 番号 87)
P49685_S 342_1	GPR15_S 342	0.965	0.036	GPR15	P49685	S	342	_1	GSSTETSDS HLTKALSTF IHAEDFARR RKRS (配列

10

20

30

40

【表 1 - 2】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2F C	FDR	遺伝 子	UniPro t ID	アミノ 酸	位置	多重度	配列ウィン ドウ
									番号 88)
P14316- 2_T336_1	IRF2_T33 8	1.204	0.040	IRF2	P14316 -2	T	336	_1	SSRPDRETR ASVIKKTSDI TQARVKSC (配列番号 89)
O75427_S 432_1	LRCH4_S 432	1.432	0.004	LRCH 4	O7542 7	S	432	_1	RQQQSSGA WGAPRKDS LLKPGLRAV VGGAAA (配 列番号 90)
O95819- 4_S519_1	MAP4K4 _S550	0.952	0.007	MAP4 K4	O9581 9-4	S	519	_1	HSQQPPPPQ QERSKPSFH APEPKAHYE PADR (配列 番号 91)
Q13177_S 64_1	PAK2_S6 4	1.233	0.017	PAK2	Q1317 7	S	64	_1	PRHKIISIFSG TEKGSKKKE KERPEISPPS D (配列番号 92)
Q04759_S 370_1	PRKCQ_ S370	0.827	0.044	PRKC Q	Q0475 9	S	370	_1	KMCHLPEPE LNKERPSLQ IKLKIEDFIL HKM (配列 番号 93)
Q9Y6M7- 13_S61_1	SLC4A7_ S52	1.146	0.017	SLC4 A7	Q9Y6 M7-13	S	61	_1	LESHRAVYI GVHVPFSKE SRRRHRHR GHKHH (配 列番号 94)
Q01082_S 2358_1	SPTBN1_ S2358	1.212	0.008	SPTB N1	Q0108 2	S	2358	_1	GKREKDKE KDKEKRFSL FGKKK (配 列番号 95)
O94804_S 13_2	STK10_S 13	2.125	0.014	STK10	O9480 4	S	13	_2	__MAFANF RRILRLSTFE KRKSREYEH VRR
O94804_ T14_2	STK10_T 14	2.125	0.014	STK10	O9480 4	T	14	_2	__MAFANFR RILRLSTFEK RKSREYEHV RRD (配列番 号 96)
P55327- 2_S136_1	TPD52_S 176	0.941	0.044	TPD52	P55327 -2	S	136	_1	ITKKLEDVK NSPTFKSFE EKVENLKSK VGGT (配列 番号 97)
P57075- 3_T6_1	UBASH3 A_T6	1.261	0.004	UBAS H3A	P57075 -3	T	6	_1	__M AAGETQLY AKVSNKLLK SRSS (配列 番号 98)
P15498- 2_S748_1	VAV1_S7 80	1.440	0.008	VAV1	P15498 -2	S	748	_1	FKEPEKRTIS RPAVGSTKY FGTAKARY DFCA (配列 番号 99)
P15498- 2_T749_1	VAV1_T 781	1.518	0.040	VAV1	P15498 -2	T	749	_1	KEPEKRTIS RPAVGSTKY FGTAKARY DFCAR (配列 番号 100)

10

20

30

40

【表 1 - 3】

表 1B: 4-1BB/CD3z CAR 刺激の後に log2FC カットオフを満たした 74 種の PO4 部位

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウィン ドウ
O75582_S 376_1	RPS6KA5 _S376	1.83 1	1.000	RPS6 KA5	O75582	S	376	_1	PAALPQSSE KLFQGYSFV APSILFKRN AAVI (配列 番号 101)
O94804_S 13_2	STK10_S1 3	1.78 6	0.404	STK1 0	O94804	S	13	_2	MAFANF RRILRLSTFE KRKSREYEH VRR (配列番 号 102)
O94804_T 14_2	STK10_T1 4	1.78 6	0.404	STK1 0	O94804	T	14	_2	MAFANFR RILRLSTFEK RKSREYEHV RRD (配列番 号 103)
P12259_S 859_1	F5_S859	- 1.71 5	1.000	F5	P12259	S	859	_1	VTGIRLLSL GAGEFKSQE HAKHKGPK VERDQ (配 列番号 104)
O75582_S 381_1	RPS6KA5 _S381	1.62 8	1.000	RPS6 KA5	O75582	S	381	_1	QSSEKLFQG YSFVAPSILF KRNAAVIDP LQF (配列番 号 105)
O94768_S 10_1	STK17B_S 10	1.55 2	1.000	STK1 7B	O94768	S	10	_1	MSRR RFDCRSISGL LTTTPQIPIK M (配列番号 106)
Q14241_S 163_1	TCEB3_S1 63	1.47 0	1.000	TCEB 3	Q14241	S	163	_1	RSYSPDHRQ KKHRKLSEL ERPHKVSHG HERR (配列 番号 107)
Q8NFC6_S 800_1	BOD1L1_S 800	1.40 2	1.000	BOD1 L1	Q8NFC6	S	800	_1	DKTERKSKH RNERKLSVL GKDGKPVSE YIHK (配列番 号 107)
P01042_S 332_1	KNG1_S3 32	- 1.31 6	1.000	KNG1	P01042	S	332	_1	YFIDFVARE TTCSESNE ELTESCETK KLGQ (配列 番号 108)
Q9UQ35_S 2020_2	SRRM2_S 2020	- 1.27 3	1.000	SRRM 2	Q9UQ35	S	2020	_2	RSRSRTSPV TRRRSRRT PPAIRRRSR RTP (配列番 号 109)
Q9UQ35_T 2022_2	SRRM2_T 2022	- 1.27 3	1.000	SRRM 2	Q9UQ35	T	2022	_2	RSRTSPVTR RRSRRTTP AIRRRSR TPLL (配列 番号 110)

10

20

30

40

【表 1 - 4】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウイン ドウ
Q9NRJ4_ S1373_1	TULP4_S1 373	- 1.18 0	1.000	TULP 4	Q9NRJ4	S	1373	_1	VKKEARTLS DFNSLISSPH LGREKKKV KSQK (配列 番号 111)
P62753_S 240_2	RPS6_S24 0	1.17 1	1.000	RPS6	P62753	S	240	_2	QEQLAKRRR LSSLRASTS KSESSQK (配列番号 112)
Q9Y4A5- 2_T1604_1	TRRAP_T 1622	1.12 2	1.000	TRRA P	Q9Y4A5- 2	T	1604	_1	NPNRFITLL PGGAQTAV RPGSPSTST MRLD (配列 番号 113)
Q9UEY8_ S423_2	ADD3_S4 23	1.07 1	1.000	ADD3	Q9UEY8	S	423	_2	ATVTAFSFE DDTVPLSPL KYMAQRQK REKTR (配列 番号 114)
Q13557- 8_S315_2	CAMK2D_ S315	1.05 8	1.000	CAM K2D	Q13557-8	S	315	_2	LKGAILTM LATRNFSAA KSLLKKPDG VKES (配列 番号 115)
Q13557- 8_S319_2	CAMK2D_ S319	1.05 8	1.000	CAM K2D	Q13557-8	S	319	_2	ILTTMLATR NFSAAKSL KKPDGVKES TESS (配列番 号 116)
Q9UN19- 2_Y139_1	DAPP1_Y 139	1.01 6	1.000	DAPP 1	Q9UN19- 2	Y	139	_1	VLKHPYPRK VEEPSIYESV RVHTAMQT GRTE (配列 番号 117)
Q15287_S 251_1	RNPS1_S2 51	- 1.00 9	1.000	RNPS 1	Q15287	S	251	_1	TAVLAPWP RPPPRFSPP RRMLPPPPM WRRS (配列 番号 118)
Q6NYC8_ S209_2	PPP1R18_ S209	- 1.00 3	1.000	PPP1 R18	Q6NYC8	S	209	_2	LSPGETPERS LRLAESREQ SPRRKEVES RLS (配列番 号 119)
Q6NYC8_ S213_2	PPP1R18_ S213	- 1.00 3	1.000	PPP1 R18	Q6NYC8	S	213	_2	ETPERSLRL AESREQSPR RKEVESRLS PGES (配列 番号 120)
Q13085_S 23_1	ACACA_S 23	0.96 1	1.000	ACAC A	Q13085	S	23	_1	AQPLELNQH SRFIIGSVSE DNSEDEISN LVK (配列番 号 121)
P10747- 2_Y90_1	CD28_Y20 9	0.93 1	1.000	CD28	P10747-2	Y	90	_1	MTPRRPGPT RKHYQPYA PPRDFAAYS (配列番号

10

20

30

40

【表 1 - 5】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウィン ドウ
									122)
Q92956- 2_S156_1	TNFRSF14 _S240	0.93 0	0.560	TNFR SF14	Q92956-2	S	156	_1	VKRRKPRG DVVKVIVSV QRKRQEAE GEATVI (配 列番号 123)
Q04721_S 2070_1	NOTCH2_ S2070	- 0.92 5	1.000	NOTC H2	Q04721	S	2070	_1	HHDIVRLLD EYNVTPSP GTVLTSALS PVIC (配列番 号 124)
P50402_S 8_1	EMD_S8	- 0.92 1	1.000	EMD	P50402	S	8	_1	MD NYADLSDE LTLLRRYN IPH (配列番 号 125)
P29590_S 480_1	PML_S480	0.91 7	1.000	PML	P29590	S	480	_1	DLDVSNTTT AQKRKCSQ TQCPRKVIK MESEE:GED VSNTTTAQK RKCSQTQCP RKVIKMESE E (配列番号 126)
Q14005- 3_S144_1	IL16_S845	0.90 4	1.000	IL16	Q14005-3	S	144	_1	IRASSSSSIR QRISSFETFG SSQLPDKGA Q (配列番号 127)
O75152_S 290_1	ZC3H11A _S290	0.88 8	1.000	ZC3H 11A	O75152	S	290	_1	LVRLSLTER LGKRKFSAG GDSDPPLKR SLAQ (配列 番号 128)
P48729_T 321_1	CSNK1A1 _T321	0.88 0	1.000	CSNK 1A1	P48729	T	321	_1	AQQAASSSG QGQQAQTP TGKQTDKT KSNMKG (配 列番号 129)
Q96A57_ Y29_2	TMEM230 _Y29	0.87 4	1.000	TME M230	Q96A57	Y	29	_2	SSKVKYSRL SSTDDGYID LQFKKTPPK IPYK (配列番 号 130)
Q02040_S 444_1	AKAP17A _S444	0.87 2	1.000	AKAP 17A	Q02040	S	444	_1	RKERELRER LLSILLSKKP DDSHTHDEL GVA (配列番 号 131)
Q8WVB3_ T476_1	HEXDC_T 476	0.86 9	1.000	HEXD C	Q8WVB3	T	476	_1	LLQDLSEVS APPLPPTSPG RDVAQDP (配列番号 132)
Q6ZSZ5_ S1160_1	ARHGEF1 _S1160	0.86 4	1.000	ARH GEF1 8	Q6ZSZ5	S	1160	_1	LPGPAPSPL PATPLSAKE DASKEDVIF F (配列番号 133)

10

20

30

40

【表 1 - 6】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウイン ドウ
Q8TBZ3- 4_S395_1	WDR20_S 465	0.86 2	1.000	WDR 20	Q8TBZ3- 4	S	395	_1	MDGAIASG VSKFATLSL HDRKERHH EKDHKR (配 列番号 134)
P14316- 2_T336_1	IRF2_T338	0.85 3	1.000	IRF2	P14316-2	T	336	_1	SSRPDRETR ASVIKKTSDI TQARVKSC (配列番号 135)
Q9UEY8_ S402_2	ADD3_S4 02	0.85 3	1.000	ADD3	Q9UEY8	S	402	_2	YAYRHPLIR EKPRHKSDV EIPATVTAFS FED (配列番 号 136)
O75152_S 295_1	ZC3H11A _S295	0.85 3	1.000	ZC3H 11A	O75152	S	295	_1	LTERLGKRK FSAGGSDP PLKRSLAQR LGKK (配列 番号 137)
Q9NZJ0_ S679_1	DTL_S679	- 0.85 2	1.000	DTL	Q9NZJ0	S	679	_1	LAMAAKRR AENSPRSPS SQTPNSRRQ SGKK (配列 番号 138)
Q04721_S 2081_1	NOTCH2_ S2081	0.85 2	1.000	NOTC H2	Q04721	S	2081	_1	NVTPSPPGT VLTSALSPVI CGPNRSFSL LKH (配列番 号 139)
Q02880- 2_S1447_ 1	TOP2B_S1 452	0.84 8	1.000	TOP2 B	Q02880-2	S	1447	_1	HDKKSQDF GNLFSFPSY SQKSEDDSA KFDSN (配列 番号 140)
P29590_S 512_2	PML_S512	0.83 7	1.000	PML	P29590	S	512	_2	KEARLARSS PEQPRPSTS KAVSPPHLD GPPS (配列 番号 141)
Q15691_S 155_1	MAPRE1_ S155	0.82 8	1.000	MAP RE1	Q15691	S	155	_1	SLVAPALNK PKKPLTSSS AAPQRPIS QRTA (配列 番号 142)
P62328_T 23_1	TMSB4X_ T23	0.82 4	1.000	TMSB 4X	P62328	T	23	_1	AEIEKFDKS KLKKTETQE KNPLPSKETI EQE (配列番 号 143)
O94906_S 143_1	PRPF6_S1 43	0.81 8	0.975	PRPF 6	O94906	S	143	_1	IEKYRMERP KIQQQFSDL KRKLAEVTE EEWL (配列 番号 144)
Q9Y2V2_ S26_2	CARHSP1 _S26	- 0.81 6	1.000	CARH SP1	Q9Y2V2	S	26	_2	PPTHQASVG LLDTPRSRE RSPSPLRGN VYPS (配列

10

20

30

40

【表 1 - 7】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウイン ドウ
									番号 145)
P17535_S 90_1	JUND_S90	0.81 3	1.000	JUND	P17535	S	90	_1	ADGAPSAAP PDGLLASPD LGLLKLASP ELER (配列 番号 146)
Q86UE4_ T495_1	MTDH_T4 95	0.81 1	1.000	MTD H	Q86UE4	T	495	_1	TRPKQEKAF SLKTIISTDP AEVLVKNS QPIK (配列番 号 147)
Q96I24_T 76_1	FUBP3_T7 6	0.80 4	1.000	FUBP 3	Q96I24	T	76	_1	DDGVGNQL GALVHQRT VITEEFKVP DKMVGf (配 列番号 148)
Q96EV8_ S351_1	DTNBP1_ S351	0.79 1	0.404	DTNB P1	Q96EV8	S	351	_1	HTDREATPD GGEDSDS (配列番号 149)
Q09666_S 4903_1	AHNAK_ S4903	0.78 7	1.000	AHN AK	Q09666	S	4903	_1	PRLDFEGPD AKLSGPSLK MPSLEISAP KVTA (配列 番号 150)
Q9P2B7_ S329_1	CFAP97_S 329	0.78 4	1.000	CFAP 97	Q9P2B7	S	329	_1	KHEPDVSSK SSSVLDSSL DHRHKQKV LHDTM (配 列番号 151)
Q8WUZ0_ T118_3	BCL7C_T 118	0.78 0	1.000	BCL7 C	Q8WUZ0	T	118	_3	SEGSLOKGT EPSPGGTPQ PSRPVSPAG PPEG (配列 番号 152)
Q8WUZ0_ S122_3	BCL7C_S1 22	0.78 0	1.000	BCL7 C	Q8WUZ0	S	122	_3	LQKGTEPSP GGTPQPSRP VSPAGPPEG VPEE (配列 番号 153)
Q8WUZ0_ S126_3	BCL7C_S1 26	0.78 0	1.000	BCL7 C	Q8WUZ0	S	126	_3	TEPSGGTP QPSRPVSPA GPPEGVPEE AQPP (配列 番号 154)
Q8N9B5- 2_S962_1	JMY_S974	0.77 5	1.000	JMY	Q8N9B5- 2	S	962	_1	SIHEALRIK EASPESEDE EEALPCTDW EN (配列番 号 155)
Q9Y4F9_ S175_1	FAM65B_ S175	0.76 8	1.000	FAM6 5B	Q9Y4F9	S	175	_1	KQAFATSPA SKAARESLT EINRSFKEY TENM (配列 番号 156)
Q9BXP5- 5_S136_1	SRRT_S13 6	0.76 6	1.000	SRRT	Q9BXP5- 5	S	136	_1	HIMQHHVLP IQARLGSLAE IDLGVPVPPV MKT (配列番

10

20

30

40

【表 1 - 8】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウイン ドウ
									号 157)
P55201- 3_S75_2	BRPF1_S7 5	0.76 4	1.000	BRPF 1	P55201-3	S	75	_2	KHKKKGRQ SRPANKQSP SPSEVSQSP GREVM (配 列番号 158)
P17936_S 201_1	IGFBP3_S 201	- 0.76 2	0.975	IGFB P3	P17936	S	201	_1	YKVDYESQS TDTQNFSS SKRETEYGP CRRE (配列 番号 159)
Q99638_S 375_2	RAD9A_S 375	0.75 2	1.000	RAD9 A	Q99638	S	375	_2	KFRSLFFGSI LAPVRSPQG PSPVLAEDS EGE (配列番 号 160)
P55201- 3_S77_2	BRPF1_S7 7	0.74 8	1.000	BRPF 1	P55201-3	S	77	_2	KKKGRQSRP ANKQSPSPS EVSQSPGRE VMSY (配列 番号 161)
Q13029- 5_S220_1	PRDM2_S 421	0.74 2	1.000	PRD M2	Q13029-5	S	220	_1	RRHERRHEA GLKRKPSQT LQPSIDLAD GKAS (配列 番号 162)
Q7LBC6_ S798_1	KDM3B_S 798	0.72 7	1.000	KDM 3B	Q7LBC6	S	798	_1	FSQENKAPF EAVKRFSLD ERSLACRQD SDSS (配列 番号 163)
Q7L099- 2_T4_1	RUFY3_T 4	0.72 7	1.000	RUFY 3	Q7L099-2	T	4	_1	MAETPPPPPT AGAESCSEE P (配列番号 164)
Q9UQ35_ S1984_1	SRRM2_S 1984	- 0.72 5	1.000	SRRM 2	Q9UQ35	S	1984	_1	RSRRTSPIT RRRSRRTS PVTRRRSRS RTS (配列番 号 165)
Q92841_ Y580_1	DDX17_Y 580	0.71 8	1.000	DDX1 7	Q92841	Y	580	_1	SRYRTSSA NNPNLMYQ DECRRRLRG VKDGG (配 列番号 166)
Q15418- 2_S389_1	RPS6KA1 _S380	0.71 6	1.000	RPS6 KA1	Q15418-2	S	389	_1	GIPPSAGAH QLFRGFSEV ATGLMEDD GKPRA (配 列番号 167)
P46013_S 1136_1	MKI67_S1 136	0.71 4	1.000	MKI6 7	P46013	S	1136	_1	DEKTTKIAC KSPPESVD TPTSTKQWP KRSL (配列 番号 168)
Q8WVB3_ S477_1	HEXDC_S 477	0.71 3	1.000	HEXD C	Q8WVB3	S	477	_1	LQDLSEVSA PPLPTSPGR DVAQDP (配

10

20

30

40

【表 1 - 9】

UniProt 特徴	遺伝子特 徴	log2 FC	FDR	遺伝 子	UniProt ID	アミノ 酸	UniProt 位置	多重度	配列ウイン ドウ
									列番号 169)
Q9NYF3_ S273_1	FAM53C_ S273	- 0.70 6	1.000	FAM5 3C	Q9NYF3	S	273	_1	LPWRPRGLR NLPRSRSQP CDLDARKT GVKRR (配 列番号 170)
O94768_S 12_1	STK17B_S 12	0.70 5	1.000	STK1 7B	O94768	S	12	_1	MSRRRF DCRSISGLLT TTPQIPIKME N (配列番号 171)
Q96RK0_ S1382_2	CIC_S138 2	0.70 2	1.000	CIC	Q96RK0	S	1382	_2	PEEVLPSPIL QSLATSPRAI LGSYRKRR KNS (配列番 号 172)
Q01433_S 100_1	AMPD2_S 100	0.70 2	0.975	AMP D2	Q01433	S	100	_1	EARGGLGAP PLQSARSLP GPAPCLKHF PLDL (配列 番号 173)

10

20

【 0 2 6 7 】

【表 2 - 1】

表 2A: 45 分で CD28/CD3z CAR 刺激によって最も上方調節された 20 種の PO4 部位

Log2FC ランク	UniProt 特徴	遺伝子特徴	Log2FC
1	O75582_S381_1	RPS6KA5_S381	4.884
2	O94768_S10_1	STK17B_S10	4.690
3	O75582_S376_1	RPS6KA5_S376	4.436
4	Q14241_S163_1	TCEB3_S163	3.851
5	O94804_S13_2	STK10_S13	3.631
6	O94804_T14_2	STK10_T14	3.631
7	Q8NFC6_S800_1	BOD1L1_S800	3.568
8	Q6ZSZ5_S1160_1	ARHGEF18_S1160	3.496
9	P29590_S480_1	PML_S480	3.364
10	Q02880-2_S1447_1	TOP2B_S1452	3.248
11	Q9UN19-2_Y139_1	DAPP1_Y139	3.185
12	P62753_S240_2	RPS6_S240	3.168
13	O75937_S35_1	DNAJC8_S35	3.126
14	P14316-2_T336_1	IRF2_T338	3.121
15	O75152_S290_1	ZC3H11A_S290	3.107
16	Q9Y4F9_S175_1	FAM65B_S175	3.094
17	Q5TDH0_S194_1	DDI2_S194	3.085
18	P19338_T583_1	NCL_T583	2.993
19	O75152_S295_1	ZC3H11A_S295	2.981
20	Q14005-3_S144_1	IL16_S845	2.944

10

20

30

【 0 2 6 8 】

【表 2 - 2】

表 2B: 45 分で 4-1BB/CD3z CAR 刺激によって最も上方調節された 20 種の PO4 部位

Log2FC ランク	UniProt 特徴	遺伝子特徴	Log2FC
1	O94768_S10_1	STK17B_S10	4.617
2	O75582_S376_1	RPS6KA5_S376	2.957
3	Q14241_S163_1	TCEB3_S163	2.886
4	Q8NFC6_S800_1	BOD1L1_S800	2.800
5	O94804_S13_2	STK10_S13	2.749
6	O94804_T14_2	STK10_T14	2.749
7	Q6ZSZ5_S1160_1	ARHGEF18_S1160	2.538
8	P29590_S480_1	PML_S480	2.442
9	P62753_S240_2	RPS6_S240	2.425
10	Q5VWG9_S199_1	TAF3_S199	2.323
11	Q9Y4A5-2_S2059_1	TRRAP_S2077	2.318
12	Q15149_S4406_1	PLEC_S4406	2.303
13	Q14005-3_S144_1	IL16_S845	2.275
14	Q92841_S599_1	DDX17_S599	2.262
15	O75582_S381_1	RPS6KA5_S381	2.252
16	Q5TDH0_S194_1	DDI2_S194	2.215
17	O75152_S290_1	ZC3H11A_S290	2.181
18	O75937_S35_1	DNAJC8_S35	2.172
19	O75152_S295_1	ZC3H11A_S295	2.135
20	P62328_T23_1	TMSB4X_T23	2.129

【 0 2 6 9】

【表 3 - 1】

表3:刺激されたCD28/CD3zと4-1BB/CD3z CAR T細胞との間で差次的に発現された1,673種の遺伝子

遺伝子	log2FC	FDR
GFPT2	-6.84	4.27E-03
LINC00891	-5.83	9.03E-03
EPHA4	-5.51	6.11E-04

10

20

30

40

【表 3 - 2】

遺伝子	log2FC	FDR
NPIP9	-5.28	2.87E-03
VIPR1	-5.01	2.77E-03
CACNA1I	-4.95	7.17E-03
VSIG1	-4.57	4.07E-04
CTDSPL	-4.43	3.68E-03
CTB-133G6.1	-4.37	2.09E-03
RP1-193H18.2	-4.36	3.68E-03
CTC-523E23.1	-4.20	1.28E-03
VIPR1-AS1	-4.16	1.86E-03
SBK1	-4.11	2.32E-03
CTC-523E23.4	-4.08	2.36E-03
ST8SIA1	-4.02	9.68E-04
METTL7A	-4.01	3.29E-03
AC004067.5	-3.96	2.73E-04
GPR155	-3.85	1.28E-03
NUAK2	-3.84	2.34E-03
GPA33	-3.84	2.67E-03
RP11-1000B6.8	-3.84	4.73E-03
EDAR	-3.83	9.85E-03
CTC-523E23.5	-3.80	2.55E-03
LMTK3	-3.80	3.73E-03
MGAT5B	-3.77	5.90E-03
RP11-285F7.2	-3.68	1.34E-03
RP11-245D16.4	-3.65	3.51E-04
HPSE2	-3.65	2.94E-03
PLCD1	-3.61	1.78E-03
YPEL4	-3.59	5.01E-03
RP1-221C16.8	-3.56	6.91E-04
AMPH	-3.55	1.93E-03
RP11-747H7.3	-3.54	2.06E-03
SOX13	-3.53	7.59E-03
ADAM23	-3.52	8.06E-03
RP11-730K11.1	-3.51	3.73E-03
LRRC2	-3.50	4.19E-03
KLF2	-3.45	3.43E-04
ADAM28	-3.44	2.23E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3】

遺伝子	log2FC	FDR
C6orf222	-3.40	3.31E-03
PTPRO	-3.38	1.00E-03
ICAM4	-3.37	7.14E-03
DAPK2	-3.36	3.93E-03
TSC22D3	-3.35	1.40E-03
KRT81	-3.35	1.96E-03
MAP2K6	-3.34	2.07E-03
LINC00880	-3.34	8.73E-03
IL7R	-3.33	3.26E-04
TMEM169	-3.32	7.50E-04
TCF7	-3.30	1.69E-03
RP11-147L13.8	-3.29	1.35E-03
FAM65B	-3.28	1.24E-04
YPEL3	-3.28	1.58E-03
RP5-1184F4.7	-3.28	3.34E-03
RP13-890H12.2	-3.28	3.56E-03
RP11-182J1.3	-3.28	6.08E-03
LDLRAP1	-3.27	1.68E-03
CTC-523E23.11	-3.27	1.97E-03
TBXA2R	-3.26	2.31E-03
RP11-203J24.8	-3.26	2.75E-03
RP11-44F14.6	-3.25	6.11E-04
PBXIP1	-3.24	9.99E-04
RP3-406P24.5	-3.23	3.29E-03
CTD-2284J15.1	-3.22	2.32E-03
MRV11	-3.18	1.93E-03
OCM	-3.17	2.71E-03
SULT1B1	-3.11	3.15E-03
RP11-666A8.8	-3.10	3.14E-03
RP11-435I10.4	-3.09	7.10E-03
SORL1	-3.07	4.10E-04
EEPD1	-3.06	7.04E-04
MAP6	-3.06	6.31E-03
KCNMB4	-3.05	3.21E-03
ZSWIM5	-3.05	5.84E-03
MPP7	-3.03	2.41E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4】

遺伝子	log2FC	FDR
RP1-47M23.3	-3.02	2.75E-03
RND1	-3.00	2.29E-03
NR5A2	-2.99	3.08E-03
GCNT4	-2.99	7.06E-03
C16orf74	-2.97	3.70E-03
BTBD8	-2.94	4.41E-03
KCNC1	-2.93	9.93E-03
YPEL1	-2.92	4.41E-03
NCF2	-2.92	5.64E-03
STK38	-2.89	1.24E-04
TMEM63A	-2.88	3.51E-04
GPR146	-2.88	8.13E-03
SMIM14	-2.87	1.96E-03
PRAM1	-2.85	2.41E-03
RP11-374F3.5	-2.84	2.46E-03
GAS6	-2.83	4.18E-03
FCGBP	-2.81	1.75E-03
AJ003147.11	-2.80	7.11E-03
AMZ1	-2.79	2.58E-03
KCNQ2	-2.79	9.51E-03
RP11-520H14.7	-2.77	9.99E-03
RASA3	-2.76	1.24E-04
C11orf21	-2.76	7.50E-04
GLIPR1L2	-2.75	2.99E-03
PPIAL4G	-2.73	7.04E-03
TRGV2	-2.73	7.74E-03
ABTB1	-2.71	1.30E-03
GPR61	-2.71	5.01E-03
AMOT	-2.71	6.20E-03
COL6A1	-2.71	9.01E-03
RP11-798M19.6	-2.70	2.50E-03
PASK	-2.67	7.27E-04
HIP1	-2.67	4.90E-03
KRT73	-2.66	3.60E-03
RP11-775C24.3	-2.66	5.70E-03
RP11-405M12.4	-2.66	6.65E-03

10

20

30

40

【表 3 - 5】

遺伝子	log2FC	FDR
RP11-401P9.4	-2.66	7.37E-03
RP11-483E17.1	-2.65	1.47E-03
PROCR	-2.65	1.78E-03
LINC00886	-2.65	2.41E-03
C1orf21	-2.65	6.86E-03
LINC00426	-2.64	8.64E-04
FAM8A1	-2.64	9.10E-04
CTC-378H22.2	-2.64	6.47E-03
AC130469.1	-2.63	2.15E-03
C16orf86	-2.63	2.89E-03
CTD-2540F13.2	-2.63	4.22E-03
RP5-1009E24.9	-2.62	2.59E-03
INMT	-2.61	9.78E-03
PLAG1	-2.60	2.36E-03
CTC-490E21.11	-2.60	6.17E-03
ATXN7L1	-2.59	3.34E-03
NHLRC4	-2.59	4.49E-03
JAKMIP3	-2.59	7.10E-03
PRODH	-2.58	5.42E-03
ACACB	-2.58	5.90E-03
C2orf15	-2.57	4.48E-03
AC008746.12	-2.56	1.77E-03
RP11-356J5.12	-2.55	3.14E-03
TCP11L2	-2.54	1.50E-03
ARHGAP5-AS1	-2.54	4.41E-03
ATP8B3	-2.53	1.55E-03
ZNF763	-2.53	3.21E-03
LINC00861	-2.53	5.62E-03
TP53INP1	-2.53	6.31E-03
FLNB-AS1	-2.52	5.63E-03
AGO4	-2.51	1.78E-03
RP11-55K13.1	-2.51	4.05E-03
RP4-761J14.10	-2.51	6.40E-03
FAM102A	-2.50	7.05E-04
OLFM2	-2.50	1.82E-03
COLGALT2	-2.50	4.28E-03

10

20

30

40

【表 3 - 6】

遺伝子	log2FC	FDR
NSG1	-2.49	5.38E-03
CTDSP2	-2.48	3.66E-04
RP5-1009E24.8	-2.48	1.90E-03
CTC-453G23.8	-2.48	2.41E-03
C5	-2.48	2.98E-03
EIF1B-AS1	-2.46	9.52E-03
APBA2	-2.45	7.08E-04
DBP	-2.45	3.09E-03
MTSS1	-2.45	4.42E-03
CTC-523E23.3	-2.44	3.04E-03
ADAMTS6	-2.44	7.07E-03
RP11-540O11.1	-2.43	4.30E-03
RP3-510D11.2	-2.43	4.72E-03
RP11-539L10.2	-2.42	2.02E-03
TC2N	-2.41	9.03E-04
SPOCK2	-2.40	1.99E-03
RP11-329N15.3	-2.39	3.38E-03
GIPC3	-2.38	4.65E-03
TSPAN2	-2.38	7.26E-03
NLRP1	-2.37	8.64E-04
NELL2	-2.37	1.09E-03
RAB37	-2.36	1.69E-03
PTGES2-AS1	-2.35	6.59E-04
AC109826.1	-2.34	1.57E-03
MT1F	-2.34	8.40E-03
CALCOCO1	-2.33	1.30E-03
ITGA6	-2.33	2.55E-03
RP11-804H8.6	-2.33	2.97E-03
RP5-1092A3.4	-2.33	4.72E-03
RP5-837J1.6	-2.33	8.13E-03
RFX8	-2.32	3.84E-03
ATP8A2	-2.32	4.15E-03
PRRT1	-2.32	5.49E-03
CNPY4	-2.31	2.85E-04
FAM214A	-2.31	2.12E-03
KLF3	-2.31	2.58E-03

10

20

30

40

【表 3 - 7】

遺伝子	log2FC	FDR
RP11-401P9.5	-2.31	7.84E-03
HSD17B11	-2.29	2.70E-04
FLNB	-2.29	4.38E-04
TRBV23-1	-2.29	6.98E-03
CACNA1C	-2.29	7.73E-03
RP11-563J2.3	-2.28	4.73E-03
LINC00899	-2.28	8.74E-03
HVCN1	-2.27	1.83E-03
SCML4	-2.27	3.52E-03
OPRL1	-2.27	5.98E-03
NMT2	-2.26	1.61E-03
ABCD2	-2.25	1.20E-03
PRRT2	-2.24	6.33E-03
FOXE1	-2.24	7.21E-03
RP4-791M13.4	-2.24	8.79E-03
KLHL24	-2.22	3.79E-03
OR10G2	-2.21	8.90E-03
PIK3IP1-AS1	-2.21	8.93E-03
GIMAP4	-2.20	1.97E-03
ABLIM1	-2.20	2.27E-03
SPON2	-2.20	2.97E-03
RP11-455I9.1	-2.20	9.98E-03
DPEP2	-2.19	1.57E-03
P2RY4	-2.19	6.25E-03
TMC4	-2.19	8.28E-03
ABCA7	-2.18	2.99E-03
PIK3IP1	-2.18	3.77E-03
C1orf145	-2.18	4.04E-03
RP11-277P12.20	-2.17	2.34E-03
SUOX	-2.17	6.75E-03
FOXO4	-2.16	1.34E-03
TRGV10	-2.15	1.73E-03
TMEM107	-2.15	1.93E-03
KB-1732A1.1	-2.15	3.78E-03
RP11-464F9.22	-2.15	6.75E-03
MFGE8	-2.15	7.74E-03

10

20

30

40

【表 3 - 8】

遺伝子	log2FC	FDR
ABHD4	-2.14	2.45E-03
SNED1	-2.14	6.81E-03
AC009303.2	-2.12	2.11E-03
RARB	-2.12	5.49E-03
RP11-731C17.2	-2.11	9.94E-04
GLCC11	-2.10	2.51E-03
SEPSECS-AS1	-2.10	4.04E-03
KLRC4-KLRK1	-2.09	4.59E-03
LINC01024	-2.08	1.43E-03
AQP3	-2.08	1.66E-03
CDC42BPG	-2.08	3.60E-03
SYTL2	-2.08	3.84E-03
EPB41	-2.07	5.91E-04
SERPINI1	-2.07	6.46E-03
MYOIF	-2.06	6.11E-04
PAX6	-2.06	6.14E-03
ADAM22	-2.05	1.14E-03
SEMA6C	-2.05	2.34E-03
CIQTNF3	-2.05	2.71E-03
TRGC1	-2.05	4.92E-03
CCDC109B	-2.04	5.91E-04
BCL9L	-2.04	1.35E-03
CCDC65	-2.04	2.02E-03
RP11-563J2.2	-2.04	2.11E-03
LINGO3	-2.04	2.37E-03
CTD-2540L5.6	-2.04	2.58E-03
RP11-177H2.1	-2.04	4.72E-03
KIAA1324L	-2.04	4.82E-03
FMO4	-2.04	7.97E-03
TRGV4	-2.04	9.14E-03
EPHX2	-2.03	1.03E-03
ADHFE1	-2.03	4.29E-03
FBXO32	-2.02	2.58E-03
PPEF1	-2.02	3.15E-03
CCDC102B	-2.02	4.25E-03
PKIG	-2.02	6.40E-03

10

20

30

40

【表 3 - 9】

遺伝子	log2FC	FDR
PAQR8	-2.01	4.83E-04
RCAN3	-2.01	6.09E-04
RP5-882C2.2	-2.01	2.94E-03
HSD17B6	-2.01	8.08E-03
CDC25B	-2.00	2.85E-04
THEMIS2	-2.00	9.76E-04
FCMR	-2.00	3.65E-03
FDXR	-2.00	3.68E-03
TMEM191A	-1.99	3.27E-03
SLC9A9	-1.99	3.28E-03
BBS2	-1.98	1.97E-03
STMN3	-1.98	2.94E-03
TMOD2	-1.98	3.48E-03
RP11-817I4.1	-1.98	4.45E-03
FYB	-1.97	6.11E-04
TRG-AS1	-1.96	6.78E-04
APBB1	-1.96	1.43E-03
RP11-644F5.10	-1.96	1.70E-03
GDPD1	-1.96	3.06E-03
TET1	-1.96	6.18E-03
AC015971.2	-1.96	7.17E-03
BZRAP1-AS1	-1.94	8.84E-04
ACSF2	-1.94	3.60E-03
C4orf36	-1.94	5.66E-03
CEP128	-1.93	1.03E-03
HEATR9	-1.93	6.42E-03
ACKR3	-1.92	6.20E-03
AC002467.7	-1.91	3.21E-03
FAM13A	-1.91	6.50E-03
IL24	-1.91	7.30E-03
NOL4L	-1.90	1.24E-04
DOK4	-1.90	6.51E-03
HCG27	-1.90	6.73E-03
STX1B	-1.90	9.28E-03
AC142472.6	-1.89	3.65E-03
TSPAN32	-1.89	4.09E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 0】

遺伝子	log2FC	FDR
REM2	-1.89	6.63E-03
SLC16A5	-1.89	9.27E-03
ZC3H12D	-1.89	9.76E-03
CCDC69	-1.88	2.85E-04
PECR	-1.88	7.24E-04
MMP19	-1.88	2.32E-03
PDCD4	-1.88	2.51E-03
LINC00324	-1.88	3.11E-03
ZNF92	-1.87	3.88E-04
SUN2	-1.87	6.11E-04
PCMTD2	-1.87	1.09E-03
TRGC2	-1.87	3.41E-03
TRANK1	-1.87	4.21E-03
ALDH6A1	-1.87	5.78E-03
FAM214B	-1.86	7.20E-03
LRRC46	-1.86	7.93E-03
LINC00205	-1.86	9.33E-03
LEF1	-1.85	6.11E-04
DFNB59	-1.85	5.64E-03
GS1-358P8.4	-1.84	1.30E-03
LINC01011	-1.84	6.18E-03
SESN1	-1.82	4.29E-03
KLHL3	-1.82	7.07E-03
SLFN13	-1.81	3.14E-04
CTD-2562J17.6	-1.81	1.30E-03
MANBA	-1.81	2.79E-03
RALGPS1	-1.81	6.03E-03
MGAT4A	-1.80	6.11E-04
SLC35D2	-1.80	1.81E-03
ATM	-1.80	1.97E-03
TOB1	-1.80	1.97E-03
PPP2R5C	-1.79	2.70E-04
ARL11	-1.79	7.48E-03
KRT72	-1.79	9.12E-03
ZNF563	-1.78	4.14E-03
TIFA	-1.77	2.85E-04

10

20

30

40

【表 3 - 1 1】

遺伝子	log2FC	FDR
RASGRP2	-1.77	1.27E-03
CROT	-1.77	2.41E-03
AGPAT4	-1.77	2.44E-03
GM2A	-1.77	2.89E-03
LA16c-390H2.4	-1.77	4.41E-03
PAIP2B	-1.77	6.06E-03
FBXO48	-1.76	1.20E-03
SSBP2	-1.76	1.69E-03
LINC00921	-1.76	3.07E-03
RP11-18H21.1	-1.76	5.62E-03
TP53TG1	-1.76	6.85E-03
ASTN2	-1.76	9.60E-03
KATNAL1	-1.75	7.05E-04
ZBTB18	-1.75	1.87E-03
CREBRF	-1.75	2.28E-03
AMIGO1	-1.75	8.15E-03
CDC14A	-1.74	1.67E-04
AHNAK	-1.74	7.53E-04
ADD3	-1.74	9.43E-04
AHCYL2	-1.74	1.32E-03
EFHC1	-1.74	3.70E-03
ELOVL4	-1.74	6.38E-03
STARD5	-1.73	1.20E-03
GIMAP8	-1.73	1.69E-03
ARID3A	-1.73	3.28E-03
MAP1A	-1.73	9.20E-03
LINC00649	-1.72	2.13E-03
MAGEE1	-1.72	2.15E-03
FAM227B	-1.72	2.88E-03
SYCP2	-1.72	3.02E-03
CFAP44	-1.72	9.55E-03
ZMYND10	-1.71	8.83E-03
COL6A2	-1.71	9.66E-03
9-Sep	-1.70	5.05E-04
MAP3K12	-1.70	9.43E-04
GIMAP7	-1.70	1.20E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 2】

遺伝子	log2FC	FDR
BTN3A1	-1.70	1.31E-03
HIST2H2BF	-1.70	4.28E-03
LRRC37B	-1.70	5.35E-03
DISC1	-1.70	9.27E-03
LRMP	-1.69	2.41E-03
VASH1	-1.69	4.31E-03
LINC01232	-1.69	4.87E-03
KIAA1683	-1.69	6.35E-03
CREB3L3	-1.69	7.83E-03
ODF2L	-1.68	7.24E-04
SEMA4C	-1.68	9.99E-04
FAM229A	-1.68	2.86E-03
AKTIP	-1.67	7.24E-04
IL11RA	-1.67	1.43E-03
TRIM3	-1.67	2.19E-03
SLC25A35	-1.67	4.72E-03
CTA-228A9.4	-1.67	5.78E-03
SIGIRR	-1.66	2.06E-03
PIK3R5	-1.65	1.24E-04
EGLN3	-1.65	1.97E-03
KIAA1671	-1.65	3.35E-03
RP11-378A13.2	-1.65	6.25E-03
KRBA2	-1.65	9.19E-03
SLC44A2	-1.64	6.11E-04
CCDC28A	-1.64	8.84E-04
GALNTI2	-1.64	1.85E-03
PNRC1	-1.64	3.77E-03
FBXO36	-1.64	4.65E-03
RCSD1	-1.63	1.24E-04
SPTBN1	-1.63	2.85E-04
CALHM2	-1.63	2.67E-03
GNRHR	-1.63	9.49E-03
ARRB1	-1.62	3.14E-04
FBXL20	-1.62	2.29E-03
PDE3B	-1.61	7.24E-04
ACSS1	-1.61	8.77E-04

10

20

30

40

【表 3 - 1 3】

遺伝子	log2FC	FDR
CBR3	-1.61	1.20E-03
FRAT1	-1.61	2.41E-03
RP11-667F14.1	-1.61	8.06E-03
RP13-977J11.2	-1.61	9.50E-03
CAMK4	-1.60	7.05E-04
PRMT2	-1.60	7.27E-04
KIAA1841	-1.60	2.87E-03
B3GAT2	-1.60	3.04E-03
SERPINB9P1	-1.60	3.56E-03
SLFN5	-1.60	5.57E-03
COLQ	-1.59	4.56E-03
ITGB2-AS1	-1.59	7.51E-03
ARAP3	-1.58	2.58E-03
P2RY10	-1.57	7.24E-04
ARHGAP12	-1.57	6.25E-03
RP1-283E3.8	-1.56	2.14E-03
BTN3A3	-1.55	6.37E-04
ZNF831	-1.55	3.62E-03
LAIR1	-1.55	4.12E-03
IL9R	-1.55	5.51E-03
F2R	-1.55	6.06E-03
ZNF219	-1.55	7.53E-03
ABCB1	-1.55	9.14E-03
PRKCB	-1.54	3.51E-04
LPAR5	-1.54	1.57E-03
AGER	-1.54	2.06E-03
RP11-291B21.2	-1.54	9.31E-03
S100PBP	-1.53	7.19E-04
ITGA5	-1.53	1.02E-03
OPTN	-1.53	1.20E-03
FGD3	-1.53	1.44E-03
GIMAP1	-1.53	2.36E-03
PDK2	-1.53	2.55E-03
ZBTB22	-1.53	2.58E-03
CARF	-1.53	3.07E-03
TMX4	-1.52	4.90E-04

10

20

30

40

【表 3 - 1 4】

遺伝子	log2FC	FDR
TXNDC16	-1.52	2.58E-03
CLYBL	-1.52	2.75E-03
ERICH6-AS1	-1.52	3.51E-03
CXorf21	-1.52	4.25E-03
KB-1572G7.2	-1.52	6.17E-03
CEP162	-1.52	8.92E-03
PATL2	-1.52	9.06E-03
BAD	-1.51	1.82E-03
RP11-617F23.1	-1.51	4.02E-03
RP11-180M15.7	-1.51	5.35E-03
PLCL2	-1.50	2.73E-04
RBL2	-1.50	7.05E-04
SMAD3	-1.50	8.84E-04
CCM2	-1.50	9.10E-04
SH2D3C	-1.50	1.34E-03
PYHIN1	-1.50	3.15E-03
SLC2A4RG	-1.50	4.60E-03
NECAB3	-1.50	6.06E-03
TMEM116	-1.49	2.56E-03
SGSH	-1.49	2.94E-03
TUBA1A	-1.49	5.96E-03
LYRM9	-1.49	7.44E-03
OSER1-AS1	-1.48	3.29E-03
RP11-147L13.15	-1.48	3.85E-03
SLC35E2	-1.48	4.20E-03
RP11-134G8.7	-1.48	8.05E-03
LINC01089	-1.47	2.94E-03
SENP7	-1.47	4.78E-03
SH3BP5	-1.47	5.30E-03
TRGV3	-1.47	8.66E-03
PTPN4	-1.46	7.48E-04
CBX7	-1.46	2.11E-03
DIP2A	-1.46	3.06E-03
SWAP70	-1.46	5.00E-03
ANKRA2	-1.45	1.28E-03
GIMAP6	-1.45	2.02E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 5】

遺伝子	log2FC	FDR
ARHGAP10	-1.45	3.14E-03
KIZ	-1.45	3.21E-03
C16orf54	-1.45	3.35E-03
RP11-347I19.8	-1.45	9.42E-03
GNB5	-1.44	2.85E-04
NBPF19	-1.44	1.72E-03
TRGV5	-1.44	2.14E-03
SMPD1	-1.44	4.25E-03
EHD3	-1.44	9.10E-03
KIAA0430	-1.43	1.04E-03
ADA	-1.43	2.41E-03
CRTAP	-1.43	3.18E-03
DLG4	-1.43	3.68E-03
RAD51-AS1	-1.43	3.87E-03
CDK19	-1.43	9.12E-03
GPR19	-1.43	9.62E-03
CECR1	-1.42	2.36E-03
TTC28-AS1	-1.42	2.51E-03
AMPD3	-1.42	8.84E-03
RASSF3	-1.41	5.04E-04
P2RY8	-1.41	1.81E-03
HBP1	-1.41	2.00E-03
BACE1	-1.41	2.79E-03
KCTD7	-1.41	3.15E-03
FAM117A	-1.41	3.17E-03
RP11-297D21.4	-1.41	4.28E-03
ZNF449	-1.41	5.29E-03
ZNF792	-1.41	8.86E-03
NPC1	-1.40	1.43E-03
KLC4	-1.40	1.56E-03
NLRC3	-1.40	2.03E-03
SYNE1	-1.40	4.13E-03
PLA2G6	-1.40	5.63E-03
HDAC5	-1.40	7.54E-03
SSH3	-1.40	9.07E-03
PLD2	-1.39	1.56E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 6】

遺伝子	log2FC	FDR
CBLL1	-1.39	2.36E-03
TMEM91	-1.39	5.46E-03
TMEM143	-1.39	5.62E-03
SLC25A42	-1.39	7.92E-03
SELPLG	-1.38	3.51E-04
UNKL	-1.38	1.08E-03
ING4	-1.38	1.27E-03
APAF1	-1.38	1.57E-03
AMT	-1.38	7.48E-03
ALPK1	-1.38	9.10E-03
TMEM110-MUSTN1	-1.38	9.51E-03
JAK1	-1.37	3.26E-04
BDH2	-1.37	1.40E-03
PHF21A	-1.37	1.43E-03
RP11-541N10.3	-1.37	1.67E-03
CUL4B	-1.37	1.78E-03
PCCA	-1.37	2.14E-03
PAN2	-1.37	2.28E-03
HACD4	-1.37	2.36E-03
PRCP	-1.37	3.78E-03
CBLN3	-1.37	4.41E-03
ZNF345	-1.37	4.76E-03
ATP8B2	-1.36	9.43E-04
SLC39A11	-1.36	9.94E-04
ALAD	-1.36	1.57E-03
MAP4K2	-1.36	1.64E-03
ILK	-1.36	1.70E-03
ZMYM3	-1.36	2.19E-03
CKAP2	-1.36	3.73E-03
GPSM3	-1.36	3.79E-03
TNFAIP8L1	-1.35	7.14E-04
LMBR1L	-1.35	1.43E-03
ZER1	-1.35	1.57E-03
SERINC5	-1.35	2.56E-03
KIF22	-1.35	4.53E-03
ATG2A	-1.35	8.67E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 7】

遺伝子	log2FC	FDR
WHAMM	-1.34	7.75E-04
KANSL1L	-1.34	3.09E-03
ZNF862	-1.34	3.62E-03
IDH1	-1.34	5.99E-03
FAM63A	-1.34	6.44E-03
8-Mar	-1.33	1.69E-03
ZC4H2	-1.33	2.91E-03
PCYOX1	-1.33	2.98E-03
AC009950.2	-1.33	4.11E-03
BBS9	-1.33	4.71E-03
RP11-111M22.2	-1.33	6.12E-03
BEND4	-1.33	6.57E-03
ANKRD26	-1.32	9.43E-04
PCMTD1	-1.32	2.84E-03
NMRK1	-1.32	4.18E-03
ZNF846	-1.32	7.82E-03
HERC1	-1.31	1.26E-03
PPP1R12B	-1.31	1.30E-03
TBC1D10C	-1.31	1.85E-03
CCDC28B	-1.31	2.41E-03
MAP3K7CL	-1.31	5.81E-03
DNAJC3-AS1	-1.31	6.06E-03
LINC00672	-1.31	7.86E-03
ANO8	-1.31	7.91E-03
KLF12	-1.30	1.20E-03
NDRG3	-1.30	1.96E-03
TTC9	-1.30	3.56E-03
GIMAP2	-1.30	4.57E-03
BTD	-1.30	7.44E-03
NPHP3	-1.30	7.99E-03
RP11-196G18.22	-1.30	9.55E-03
PCNT	-1.29	4.10E-04
CYTH1	-1.29	7.24E-04
NUMA1	-1.29	2.28E-03
CENPK	-1.29	3.43E-03
TFDP2	-1.29	3.90E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 8】

遺伝子	log2FC	FDR
MAP3K3	-1.29	4.28E-03
RP4-605O3.4	-1.29	9.25E-03
BTN2A2	-1.28	6.11E-04
ZNF33B	-1.28	9.51E-04
BIN2	-1.28	1.69E-03
IL16	-1.28	2.29E-03
GTF2IRD2B	-1.28	3.28E-03
DZIP3	-1.28	5.90E-03
SUSD3	-1.27	1.28E-03
KIAA0586	-1.27	1.43E-03
ZMYM1	-1.27	4.12E-03
CEP19	-1.27	4.22E-03
TTYH2	-1.27	8.60E-03
POLR3GL	-1.26	9.10E-04
COG4	-1.26	1.20E-03
BTN3A2	-1.26	1.66E-03
LIMK2	-1.26	1.69E-03
IFT80	-1.26	2.17E-03
PLCB2	-1.26	2.29E-03
MEGF9	-1.26	2.34E-03
FAM111A	-1.26	4.16E-03
CIQTNF6	-1.26	8.68E-03
MIS18BP1	-1.25	1.12E-03
BIN1	-1.25	1.64E-03
USP28	-1.25	1.81E-03
RAB29	-1.25	1.85E-03
RAB5B	-1.25	2.55E-03
CNOT6L	-1.25	2.59E-03
PPOX	-1.25	5.23E-03
SLC2A11	-1.25	7.06E-03
ERP27	-1.25	7.16E-03
RARRES3	-1.25	8.99E-03
NT5DC1	-1.24	9.14E-04
MXD1	-1.24	1.64E-03
SMYD3	-1.24	1.65E-03
CCPG1	-1.24	2.51E-03

10

20

30

40

【表 3 - 1 9】

遺伝子	log2FC	FDR
UBE2H	-1.24	2.94E-03
PSIP1	-1.23	4.73E-04
GRK5	-1.23	7.24E-04
SH3BP1	-1.23	1.26E-03
ZFP36L2	-1.23	1.59E-03
DGKA	-1.23	2.32E-03
CEP192	-1.23	4.39E-03
CTB-25B13.12	-1.23	5.98E-03
CCBL1	-1.23	8.12E-03
PHKB	-1.22	7.07E-04
CCNG1	-1.22	7.72E-04
RBBP9	-1.22	1.91E-03
ARID4A	-1.22	2.03E-03
KIAA1109	-1.22	2.87E-03
APH1B	-1.22	3.33E-03
LINC00847	-1.22	3.80E-03
ADAM8	-1.22	5.02E-03
NTAN1	-1.21	2.41E-03
TMEM19	-1.21	2.51E-03
IQSEC1	-1.21	3.34E-03
TRAV9-2	-1.21	4.56E-03
CCDC14	-1.21	5.12E-03
DGCR6L	-1.21	6.15E-03
HSDL2	-1.21	6.46E-03
HMGB2	-1.21	7.75E-03
NLRC5	-1.20	7.27E-04
CAMK2G	-1.20	7.76E-04
OPN3	-1.20	3.60E-03
TRBV6-5	-1.20	5.62E-03
FAM63B	-1.20	7.16E-03
TBC1D10A	-1.20	7.30E-03
CEP57L1	-1.20	8.13E-03
ZYG11B	-1.20	8.76E-03
SNRK	-1.19	7.32E-04
HCP5	-1.19	1.90E-03
GTF2IRD2	-1.19	2.02E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 0】

遺伝子	log2FC	FDR
SWT1	-1.19	4.73E-03
RP11-15H20.6	-1.19	4.93E-03
KIAA0319L	-1.18	2.30E-03
GMDS-AS1	-1.18	3.75E-03
TPK1	-1.18	4.47E-03
BCKDHB	-1.17	1.40E-03
RAD52	-1.17	2.47E-03
SIPA1	-1.17	2.74E-03
GBA	-1.17	2.88E-03
MLLT11	-1.17	5.26E-03
C5orf42	-1.17	5.48E-03
RNASET2	-1.16	1.97E-03
LAPTM5	-1.16	2.28E-03
PIAS3	-1.16	2.36E-03
PHYH	-1.16	2.86E-03
TCAF1	-1.16	7.15E-03
CTPS2	-1.16	7.69E-03
C14orf93	-1.16	9.80E-03
STK17A	-1.15	9.99E-04
CBFA2T2	-1.15	1.78E-03
ARRDC2	-1.15	2.45E-03
FAM168A	-1.15	2.58E-03
PPP3CB-AS1	-1.15	4.20E-03
LINC00869	-1.15	4.47E-03
SLC12A4	-1.15	6.17E-03
SIDT2	-1.15	6.76E-03
PBX2	-1.14	2.85E-04
ZBTB4	-1.14	1.03E-03
TXNIP	-1.14	2.41E-03
CAT	-1.14	2.96E-03
ING2	-1.14	3.40E-03
MROH1	-1.14	3.44E-03
MCF2L2	-1.14	4.54E-03
ZFYVE16	-1.14	7.48E-03
DBF4B	-1.14	9.72E-03
ECI2	-1.13	1.09E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 1】

遺伝子	log2FC	FDR
FLOT2	-1.13	1.54E-03
BIVM-ERCC5	-1.13	4.41E-03
ATP8A1	-1.13	4.87E-03
ZKSCAN3	-1.13	5.82E-03
SIPA1L3	-1.13	6.09E-03
TMEM204	-1.13	7.06E-03
CEP70	-1.13	9.67E-03
TMEM245	-1.12	1.97E-03
PGPEP1	-1.12	2.68E-03
ABCC5	-1.12	3.10E-03
SIPR4	-1.12	4.51E-03
RP11-819C21.1	-1.12	9.15E-03
LPXN	-1.11	3.51E-04
NDE1	-1.11	1.78E-03
RP1-39G22.7	-1.11	2.14E-03
RP11-705C15.3	-1.11	4.27E-03
PCNXL2	-1.11	4.47E-03
MBD5	-1.11	4.61E-03
ZNF441	-1.11	5.63E-03
MBOAT1	-1.11	6.15E-03
RFX3	-1.11	6.31E-03
TOM1L2	-1.11	6.34E-03
UTRN	-1.11	7.15E-03
BAZ2B	-1.11	8.90E-03
CTC1	-1.10	9.43E-04
BCAS4	-1.10	2.40E-03
ACAP2	-1.10	3.93E-03
LRCH4	-1.10	6.18E-03
ARHGAP11B	-1.10	6.20E-03
RP11-174G6.5	-1.10	6.79E-03
DEDD2	-1.10	9.02E-03
KAT6B	-1.09	1.25E-03
NIPAL3	-1.09	2.54E-03
FAM200B	-1.09	2.96E-03
MINK1	-1.09	3.04E-03
ZADH2	-1.09	3.29E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 2】

遺伝子	log2FC	FDR
RP11-57H14.4	-1.09	5.38E-03
KBTBD7	-1.09	6.78E-03
RP11-399O19.9	-1.09	6.99E-03
ZCCHC11	-1.08	2.85E-04
AKT3	-1.08	6.77E-04
HDAC6	-1.08	1.26E-03
PRKACB	-1.08	1.92E-03
ACADSB	-1.08	2.36E-03
TNRC6C	-1.08	3.73E-03
VAT1	-1.08	4.45E-03
NICN1	-1.08	5.02E-03
WBP1	-1.07	3.63E-03
ALOX12-AS1	-1.07	4.39E-03
GSTM2	-1.07	4.72E-03
PHC1	-1.07	6.37E-03
RP11-799D4.4	-1.07	9.09E-03
TTC7A	-1.06	6.43E-04
SAP30L	-1.06	1.43E-03
PIK3CB	-1.06	1.78E-03
ZNF75D	-1.06	2.47E-03
PITPNC1	-1.06	2.58E-03
UBA7	-1.06	2.58E-03
PARP8	-1.06	2.81E-03
FBXL17	-1.06	2.94E-03
CCHCR1	-1.06	6.60E-03
CEP295	-1.06	7.52E-03
CDC42SE2	-1.05	3.54E-04
SSH2	-1.05	9.43E-04
GNS	-1.05	1.09E-03
TBCK	-1.05	1.20E-03
MTERF4	-1.05	2.00E-03
SLC35E2B	-1.05	2.81E-03
LSP1	-1.05	2.91E-03
SLFN12L	-1.05	3.19E-03
PRIMPOL	-1.05	3.68E-03
CYB5A	-1.05	3.75E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 3】

遺伝子	log2FC	FDR
ARHGAP19	-1.05	4.30E-03
TRAV21	-1.05	7.16E-03
RP11-244H3.1	-1.05	7.51E-03
SGTB	-1.05	9.52E-03
UNC119	-1.04	1.78E-03
CDKN1B	-1.04	2.07E-03
ZFAND2B	-1.04	2.59E-03
SH3BP5-AS1	-1.04	3.84E-03
ZNF436	-1.04	5.23E-03
PLEKHA1	-1.04	6.44E-03
CD5	-1.04	9.83E-03
ITGB7	-1.03	1.03E-03
VPS26B	-1.03	1.03E-03
KLHL22	-1.03	1.19E-03
CCDC82	-1.03	1.66E-03
CD3G	-1.03	1.93E-03
ZNF226	-1.03	2.32E-03
HPS3	-1.03	2.58E-03
NHLRC3	-1.03	3.20E-03
KLRK1	-1.03	3.91E-03
SVBP	-1.03	4.61E-03
9-Mar	-1.03	4.69E-03
IGIP	-1.03	6.06E-03
STK10	-1.02	7.24E-04
DCK	-1.02	1.93E-03
POMT1	-1.02	2.46E-03
SIRT3	-1.02	3.87E-03
CYTH2	-1.02	4.47E-03
CRYZ	-1.02	4.71E-03
PIK3C2B	-1.02	7.16E-03
ELMOD3	-1.02	8.31E-03
UPF3A	-1.01	1.51E-03
ANKZF1	-1.01	1.90E-03
IKBKE	-1.01	1.98E-03
PRKAB2	-1.01	2.70E-03
CERK	-1.01	3.35E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 4】

遺伝子	log2FC	FDR
MYO18A	-1.01	3.68E-03
IFT122	-1.01	3.73E-03
UBL3	-1.01	5.49E-03
SPIDR	-1.00	1.20E-03
SMC4	-1.00	1.60E-03
SYT11	-1.00	2.66E-03
CXorf57	-1.00	5.73E-03
RPS6KA5	1.00	1.30E-03
HSP90AA1	1.00	3.14E-03
SEC61B	1.00	3.78E-03
EFNB1	1.00	9.10E-03
SYNJ2	1.01	1.01E-03
SPATA5L1	1.01	1.78E-03
PDIA6	1.01	2.34E-03
EIF4E	1.01	2.41E-03
FTSJ1	1.01	2.58E-03
AHSA1	1.01	2.91E-03
SYNCRIP	1.01	3.10E-03
PLOD1	1.01	3.18E-03
TIMM50	1.01	3.42E-03
BMP1	1.01	4.52E-03
SLC35C1	1.01	4.71E-03
THOP1	1.01	5.23E-03
C16orf91	1.01	5.32E-03
IKBIP	1.01	5.62E-03
MPV17L2	1.01	5.90E-03
EIF3C	1.01	6.31E-03
MSTO1	1.02	1.14E-03
MRPS23	1.02	2.72E-03
UTP6	1.02	2.75E-03
QSOX2	1.02	3.30E-03
PAM16	1.02	3.50E-03
ATF5	1.02	3.60E-03
NDUFV2	1.02	3.76E-03
HSPA9	1.02	4.41E-03
MRPL15	1.02	7.31E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 5】

遺伝子	log2FC	FDR
SPEN	1.03	3.51E-04
EIF4A3	1.03	1.03E-03
CCT4	1.03	2.32E-03
IPO5	1.03	3.29E-03
CD44	1.03	3.32E-03
TSFM	1.03	3.34E-03
IL4R	1.03	3.40E-03
ZNF771	1.03	4.80E-03
OTUD6B	1.03	5.01E-03
DDX49	1.03	5.23E-03
PHTF2	1.03	8.84E-03
TMEM33	1.04	7.27E-04
CBFB	1.04	1.34E-03
ZNF696	1.04	2.41E-03
GALE	1.04	4.41E-03
MAPKAPK3	1.04	4.50E-03
MRPL3	1.04	5.30E-03
RP11-135F9.3	1.04	5.71E-03
TXN	1.04	5.78E-03
RIOK1	1.04	6.33E-03
MECR	1.04	9.14E-03
SLAMF1	1.05	6.11E-04
GSR	1.05	1.69E-03
KTI12	1.05	2.06E-03
CAD	1.05	3.08E-03
FXN	1.05	3.22E-03
RP3-461F17.3	1.05	3.70E-03
EIF3B	1.05	4.08E-03
EIF1AX	1.05	4.71E-03
NANP	1.05	4.91E-03
PLCXD2	1.05	5.26E-03
DUS3L	1.05	5.32E-03
MIF	1.05	6.13E-03
PDCD11	1.06	1.93E-03
NAA15	1.06	2.36E-03
TBL1X	1.06	2.46E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 6】

遺伝子	log2FC	FDR
SMS	1.06	2.51E-03
TRMT10C	1.06	3.15E-03
SERTAD1	1.06	3.63E-03
HEATR3	1.06	4.15E-03
ATIC	1.06	4.43E-03
EIF3J	1.06	4.49E-03
DUSP14	1.06	6.75E-03
ADAM19	1.06	7.31E-03
FDXACB1	1.06	8.08E-03
PEA15	1.07	1.14E-03
YWHAG	1.07	1.60E-03
DNAJC25	1.07	2.36E-03
MPZL3	1.07	2.40E-03
ALDH18A1	1.07	2.94E-03
SNTB1	1.07	3.35E-03
CCT7	1.07	3.73E-03
DNAJC2	1.07	3.79E-03
RRAS2	1.07	6.26E-03
LYRM1	1.08	1.02E-03
KCNK6	1.08	1.04E-03
HYOU1	1.08	2.07E-03
FLOT1	1.08	2.36E-03
EIF5B	1.08	2.70E-03
POFUT1	1.08	2.72E-03
IPO11	1.08	2.79E-03
BCCIP	1.08	3.72E-03
HSPA8	1.08	4.04E-03
B3GALT6	1.08	4.18E-03
ABCB6	1.08	5.41E-03
PTMS	1.08	8.69E-03
ARPC5L	1.09	1.73E-03
IFT57	1.09	2.27E-03
UTP11L	1.09	2.70E-03
CCT3	1.09	3.34E-03
ERI1	1.09	3.36E-03
CAPN15	1.09	4.19E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 7】

遺伝子	log2FC	FDR
SLC27A4	1.09	5.43E-03
C3orf33	1.09	6.17E-03
COQ3	1.09	7.99E-03
FANCC	1.10	1.26E-03
SSSCA1	1.10	2.32E-03
DCAF13	1.10	2.58E-03
SERBP1	1.10	2.65E-03
NAT10	1.10	2.88E-03
SLC35F2	1.10	3.40E-03
TIMM23	1.10	3.73E-03
HSPBP1	1.10	6.33E-03
TCEB1	1.11	7.05E-04
UAP1	1.11	1.78E-03
SCO2	1.11	2.13E-03
PRPF19	1.11	2.17E-03
SRFBP1	1.11	2.70E-03
PEX5	1.11	2.71E-03
TXNRD1	1.11	2.87E-03
SRGAP2C	1.11	3.15E-03
ADO	1.11	3.91E-03
DNLZ	1.11	5.98E-03
FAM210A	1.12	1.05E-03
C8orf33	1.12	2.58E-03
AARSD1	1.12	3.80E-03
MYDGF	1.12	4.70E-03
TLE3	1.12	5.23E-03
NIFK	1.12	5.55E-03
AEN	1.12	7.61E-03
LENG9	1.12	8.61E-03
SLC5A6	1.13	1.69E-03
AK2	1.13	2.55E-03
MRPL36	1.13	2.89E-03
AMIGO2	1.13	2.95E-03
UBASH3B	1.13	3.15E-03
CENPV	1.13	3.29E-03
YIF1A	1.13	3.47E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 8】

遺伝子	log2FC	FDR
ACACA	1.13	3.66E-03
FAAP100	1.13	3.69E-03
MPHOSPH6	1.13	4.43E-03
PEX10	1.13	6.06E-03
CYSTM1	1.13	7.15E-03
ITPR1	1.14	7.24E-04
ATP2A2	1.14	1.28E-03
POLR2K	1.14	1.57E-03
LRRC59	1.14	1.66E-03
NOC2L	1.14	2.27E-03
NEDD9	1.14	2.59E-03
IDH3A	1.14	2.75E-03
RANBP1	1.14	3.35E-03
PRDX1	1.14	4.07E-03
CCT5	1.14	4.18E-03
ZNF587B	1.14	4.43E-03
GGCT	1.14	4.44E-03
GAR1	1.14	4.89E-03
TESC	1.14	5.78E-03
YDJC	1.14	5.89E-03
COMTD1	1.14	5.90E-03
MMACHC	1.15	1.78E-03
EIF4G1	1.15	1.96E-03
MAFK	1.15	2.34E-03
ABCF2	1.15	2.44E-03
POP7	1.15	2.91E-03
SRGN	1.15	3.09E-03
SLC25A33	1.15	5.16E-03
IMPDH2	1.15	6.41E-03
ALKBH2	1.15	6.45E-03
CD151	1.15	6.54E-03
FBXW9	1.15	6.62E-03
FRMD4B	1.15	9.83E-03
C16orf87	1.16	1.78E-03
LARP1B	1.16	1.97E-03
RBM14	1.16	2.23E-03

10

20

30

40

【表 3 - 2 9】

遺伝子	log2FC	FDR
CBR1	1.16	2.41E-03
GEMIN5	1.16	2.41E-03
FDX1L	1.16	4.26E-03
RRP7A	1.16	4.44E-03
NACC1	1.16	5.55E-03
ARMC6	1.16	5.55E-03
AGMAT	1.16	6.72E-03
NPM1	1.16	7.26E-03
TIMM13	1.16	9.25E-03
ATP13A3	1.17	7.24E-04
FAM98A	1.17	1.03E-03
MARS2	1.17	1.83E-03
B3GLCT	1.17	2.15E-03
UGCG	1.17	2.62E-03
RCN1	1.17	2.80E-03
ACOT7	1.17	2.91E-03
ALG3	1.17	2.94E-03
PHB	1.17	3.46E-03
MRPS26	1.17	3.71E-03
TIMM10	1.17	4.13E-03
WDR46	1.17	4.41E-03
NOP14	1.17	4.50E-03
PRKD3	1.18	6.14E-04
TIMM23B	1.18	1.03E-03
AGO2	1.18	1.09E-03
PA2G4	1.18	2.17E-03
PRADC1	1.18	3.38E-03
ABCE1	1.18	3.42E-03
WDR36	1.18	3.78E-03
BOLA2B	1.18	6.06E-03
NHP2	1.18	8.79E-03
PTPN7	1.18	8.90E-03
SLA	1.19	3.35E-04
FNDC3B	1.19	1.57E-03
MAN1A1	1.19	1.72E-03
NIP7	1.19	1.78E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 0】

遺伝子	log2FC	FDR
POLR1B	1.19	1.78E-03
PPIL1	1.19	2.42E-03
MAP2K3	1.19	2.58E-03
HMBS	1.19	3.04E-03
TOMM5	1.19	3.10E-03
MTFP1	1.19	3.78E-03
MRPS12	1.19	4.18E-03
PTRH1	1.19	4.52E-03
BAIAP2	1.19	6.13E-03
MCAT	1.19	6.65E-03
GPAT2	1.19	8.15E-03
DSTYK	1.20	1.24E-04
GRAMD4	1.20	4.10E-04
NDFIP1	1.20	1.72E-03
EIF2S1	1.20	1.82E-03
NXT1	1.20	1.91E-03
FARP2	1.20	1.93E-03
EIF4A1	1.20	2.19E-03
TMA16	1.20	2.19E-03
LTV1	1.20	2.53E-03
MRPS17	1.20	2.60E-03
NOP2	1.20	2.96E-03
IL15RA	1.20	3.38E-03
MRPL4	1.20	6.28E-03
POLR3C	1.21	6.14E-04
UHRF1BP1L	1.21	1.64E-03
COLGALT1	1.21	2.58E-03
ETF1	1.21	2.71E-03
SNRPD1	1.21	3.40E-03
GNL3	1.21	3.75E-03
CNKSR2	1.21	4.04E-03
DOT1L	1.21	4.27E-03
AHCY	1.21	5.91E-03
EEF2KMT	1.21	8.84E-03
SFXN2	1.22	1.72E-03
NUDCD1	1.22	1.82E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 1】

遺伝子	log2FC	FDR
PRMT5	1.22	2.51E-03
TBL3	1.22	2.59E-03
KDM6B	1.22	2.79E-03
NOTCH1	1.22	2.83E-03
NOC4L	1.22	3.11E-03
CCDC58	1.22	3.90E-03
SLC35G1	1.22	4.25E-03
PSMG1	1.22	5.12E-03
GNL2	1.23	1.98E-03
IMP4	1.23	2.36E-03
KLHL11	1.23	3.38E-03
RPIA	1.23	3.72E-03
FAM216A	1.23	5.63E-03
ALDH1B1	1.23	5.98E-03
STX1A	1.23	9.13E-03
ZSWIM6	1.24	1.24E-04
FAM102B	1.24	7.24E-04
KLHL8	1.24	1.51E-03
BTG3	1.24	2.34E-03
PPA1	1.24	3.34E-03
SLC46A1	1.24	3.48E-03
ETS2	1.24	3.87E-03
NUFIP1	1.25	1.93E-03
CEP83	1.25	1.96E-03
AMD1	1.25	2.84E-03
WDR3	1.25	3.34E-03
ST7	1.25	3.50E-03
C1QBP	1.25	4.65E-03
VPS9D1-AS1	1.25	9.74E-03
E2F6	1.26	1.20E-03
C1orf216	1.26	2.02E-03
RAB11FIP1	1.26	2.17E-03
CEBPB	1.26	2.25E-03
KDSR	1.26	2.62E-03
ESF1	1.26	2.87E-03
CHPF	1.26	3.11E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 2】

遺伝子	log2FC	FDR
MEX3D	1.26	3.73E-03
DCAF4	1.26	5.38E-03
CCDC85B	1.27	1.44E-03
PUS1	1.27	3.60E-03
ZNF485	1.27	5.43E-03
RP11-326C3.2	1.27	5.67E-03
IARS	1.27	6.20E-03
RUNX1	1.27	7.75E-03
IL12RB2	1.27	8.78E-03
GEMIN4	1.28	1.85E-03
SPATA24	1.28	2.23E-03
MRM1	1.28	2.55E-03
NDUFAF4	1.28	2.79E-03
SLC16A1	1.28	3.19E-03
RP11-77H9.2	1.28	3.63E-03
ZNRF1	1.28	6.69E-03
SLCO4A1	1.28	7.10E-03
HSPA5	1.29	1.43E-03
SRPRB	1.29	1.78E-03
JMJD4	1.29	1.99E-03
GNPNAT1	1.29	2.36E-03
FARSA	1.29	2.94E-03
C1orf198	1.29	4.23E-03
NCLN	1.29	4.27E-03
TTL12	1.29	4.50E-03
CH507-9B2.5	1.29	6.01E-03
RPL22L1	1.29	7.06E-03
RCAN1	1.29	7.16E-03
SETD7	1.29	8.73E-03
EPT1	1.30	1.73E-03
POLR1A	1.30	1.93E-03
AKAP1	1.30	2.06E-03
SOGA3	1.30	2.19E-03
CCT2	1.30	2.56E-03
UCHL3	1.30	2.58E-03
CD72	1.30	2.88E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 3】

遺伝子	log2FC	FDR
EEF1E1	1.30	2.94E-03
TNFSF14	1.30	3.26E-03
DES11	1.30	3.45E-03
CD320	1.30	5.63E-03
NKG7	1.30	6.51E-03
CDC42EP3	1.31	6.37E-04
TMEM70	1.31	7.27E-04
NAF1	1.31	1.29E-03
URB1	1.31	1.66E-03
FAM57A	1.31	3.73E-03
INAFM2	1.31	9.13E-03
PDP2	1.32	5.04E-04
ZC3H12C	1.32	9.43E-04
SFXN1	1.32	1.20E-03
GRWD1	1.32	2.15E-03
ZNF584	1.32	2.50E-03
SNHG15	1.32	3.49E-03
MLLT4	1.32	3.72E-03
WDR74	1.32	3.72E-03
FAM86C1	1.32	5.45E-03
DUSP2	1.32	6.25E-03
CRY1	1.33	3.51E-04
STIP1	1.33	1.01E-03
NOL10	1.33	1.30E-03
POP1	1.33	1.57E-03
MAPK6	1.33	2.06E-03
WDR77	1.33	2.35E-03
GTPBP4	1.33	2.41E-03
NOL6	1.33	3.21E-03
TRAP1	1.33	3.56E-03
ENO1	1.33	3.60E-03
DHRS11	1.33	4.24E-03
SNX10	1.34	1.33E-03
DDX31	1.34	1.57E-03
SAMSN1	1.34	1.58E-03
UTP15	1.34	2.12E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 4】

遺伝子	log2FC	FDR
RAN	1.34	2.16E-03
DHX37	1.34	2.29E-03
BZW2	1.34	2.41E-03
CYCS	1.34	2.84E-03
SIGMAR1	1.34	3.40E-03
NOP58	1.34	4.09E-03
KIF9	1.34	5.55E-03
PTPRE	1.35	2.69E-04
STAT5A	1.35	1.12E-03
LONP1	1.35	2.02E-03
PFDN2	1.35	2.28E-03
MAT2A	1.35	2.42E-03
CAMKK2	1.35	2.70E-03
NCL	1.35	2.90E-03
CHAC2	1.35	3.45E-03
PNPT1	1.35	4.41E-03
USP31	1.36	1.85E-03
BRIX1	1.36	3.11E-03
MAGI1	1.36	4.73E-03
RP3-508I15.21	1.36	7.06E-03
JARID2	1.37	1.24E-04
LARP4	1.37	7.19E-04
DCUN1D3	1.37	1.57E-03
DHX33	1.37	1.85E-03
PES1	1.37	2.79E-03
UTP14A	1.37	2.95E-03
SLIRP	1.37	2.96E-03
WDR43	1.37	3.25E-03
CLN6	1.37	3.68E-03
PAK1IP1	1.37	3.72E-03
SRXN1	1.37	4.04E-03
POLD2	1.37	6.00E-03
FGL2	1.37	8.15E-03
TOP1	1.38	2.85E-04
SPRY1	1.38	2.01E-03
TIAM1	1.38	2.12E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 5】

遺伝子	log2FC	FDR
SMYD5	1.38	2.55E-03
EIF2B3	1.38	2.72E-03
SLC25A22	1.38	2.87E-03
CDK4	1.38	3.22E-03
SFXN4	1.38	6.31E-03
GOLIM4	1.39	1.55E-03
PAM	1.39	1.70E-03
POLR1C	1.39	2.32E-03
PMM2	1.39	2.58E-03
PKM	1.39	4.38E-03
SLC9A7	1.40	1.77E-03
PTRH2	1.40	1.85E-03
PPRC1	1.40	3.11E-03
RPF2	1.40	3.40E-03
CTLA4	1.40	9.55E-03
LDHA	1.41	2.41E-03
P4HA2	1.41	2.80E-03
C12orf45	1.41	3.11E-03
PFAS	1.41	4.69E-03
STARD4	1.41	4.81E-03
SLC25A32	1.42	1.85E-03
GCNT1	1.42	2.62E-03
C10orf2	1.42	3.22E-03
PDSS1	1.42	4.40E-03
HSF5	1.42	5.30E-03
TESK1	1.43	3.54E-04
PFKP	1.43	1.28E-03
UTP20	1.43	1.53E-03
DCUN1D5	1.43	1.73E-03
EXOSC4	1.43	2.57E-03
WDR4	1.43	2.58E-03
IRS1	1.43	3.24E-03
PDCD2L	1.43	3.60E-03
CCDC71L	1.43	3.72E-03
CRISPLD1	1.43	4.18E-03
SLC39A8	1.44	9.68E-04

10

20

30

40

【表 3 - 3 6】

遺伝子	log2FC	FDR
NOP56	1.44	2.41E-03
FARSB	1.44	3.15E-03
LRP5	1.44	3.56E-03
PPARGC1B	1.44	5.30E-03
CARD9	1.44	6.44E-03
ATP1B3	1.45	7.78E-04
CDK6	1.45	9.03E-04
NOCT	1.45	1.81E-03
MBOAT7	1.45	1.88E-03
PIGW	1.45	3.60E-03
FHL1	1.45	5.56E-03
RMDN2	1.45	7.50E-03
TIMM8A	1.46	1.27E-03
PLAGL2	1.46	1.64E-03
NUP35	1.46	1.97E-03
ITGA2	1.46	3.15E-03
RRP15	1.46	3.22E-03
CISD3	1.46	4.27E-03
SCD	1.46	4.33E-03
HSPE1	1.46	5.23E-03
MIR17HG	1.46	6.06E-03
FAM3C	1.47	1.26E-03
PINX1	1.47	1.34E-03
CSRNP1	1.47	1.43E-03
DUSP5	1.47	1.57E-03
ZNHIT2	1.47	1.96E-03
DDX10	1.47	2.12E-03
WDR12	1.47	2.16E-03
TIAM2	1.47	2.56E-03
TXNDC5	1.47	2.96E-03
DPH2	1.47	3.38E-03
RGCC	1.48	9.43E-04
TSR1	1.48	2.00E-03
TFB2M	1.48	2.20E-03
HSPD1	1.48	2.58E-03
BCL2L1	1.48	3.07E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 7】

遺伝子	log2FC	FDR
SLC25A19	1.48	3.70E-03
GAREML	1.48	6.17E-03
RGS16	1.48	6.65E-03
CMTM4	1.49	1.40E-03
RCL1	1.49	1.93E-03
MAK16	1.49	2.19E-03
CTU2	1.49	3.17E-03
FAM129B	1.49	3.22E-03
EDARADD	1.49	3.29E-03
POLR3H	1.49	3.40E-03
FBXO30	1.50	3.07E-04
EED	1.50	1.10E-03
CIRH1A	1.50	1.28E-03
SDF2L1	1.50	1.72E-03
DKC1	1.50	2.19E-03
GPATCH4	1.50	2.41E-03
EBNA1BP2	1.50	2.65E-03
PIM3	1.50	3.29E-03
ATAD3B	1.50	4.33E-03
FUOM	1.50	7.48E-03
PGAM1	1.51	8.93E-04
KBTBD8	1.51	1.20E-03
PPAT	1.51	1.25E-03
MRPL12	1.51	3.07E-03
SORD	1.51	6.17E-03
RNF19A	1.52	1.67E-04
SNX8	1.52	4.90E-04
MICAL2	1.52	1.28E-03
PGAM4	1.52	2.36E-03
CYP27B1	1.52	5.56E-03
GRPEL1	1.53	1.47E-03
MYBBP1A	1.53	2.49E-03
FASN	1.53	2.56E-03
AIMP2	1.53	2.58E-03
FKBP4	1.53	2.87E-03
NFIL3	1.54	2.01E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 8】

遺伝子	log2FC	FDR
ENDOD1	1.54	2.36E-03
MZB1	1.54	5.01E-03
MIR155HG	1.54	9.14E-03
DHODH	1.55	1.28E-03
NOLC1	1.55	2.91E-03
HOMER1	1.55	3.46E-03
HYAL2	1.55	3.57E-03
SNHG3	1.55	3.78E-03
NOP16	1.55	3.79E-03
SLFN1-AS1	1.55	8.12E-03
COA7	1.56	3.34E-03
PRDX4	1.56	5.60E-03
TMEM97	1.57	1.23E-03
NPM3	1.57	3.29E-03
ERICD	1.57	6.75E-03
FAM89A	1.58	2.94E-03
SLC19A2	1.59	3.50E-04
HNRNPAB	1.59	1.55E-03
CLECL1	1.59	1.86E-03
SEH1L	1.59	1.90E-03
TRMT1	1.59	2.36E-03
EAF2	1.59	3.90E-03
IFI30	1.59	4.69E-03
RP4-671O14.6	1.59	4.71E-03
GEM	1.59	5.66E-03
MTHFD2	1.59	6.45E-03
PTCH1	1.60	1.78E-03
PLXNA1	1.60	1.97E-03
PNO1	1.60	2.03E-03
HSP90AB1	1.60	2.78E-03
CD80	1.60	3.09E-03
SLC19A1	1.60	7.30E-03
HSPH1	1.61	2.85E-04
LRRC8B	1.61	3.66E-04
SNX9	1.61	2.19E-03
RRP1	1.61	2.58E-03

10

20

30

40

【表 3 - 3 9】

遺伝子	log2FC	FDR
PDIA5	1.61	3.73E-03
CTNNA1	1.61	4.41E-03
ITPRIPL2	1.62	3.51E-04
PER2	1.62	7.48E-04
DCTPP1	1.62	2.49E-03
RRS1	1.62	3.29E-03
SCARF1	1.62	5.49E-03
PDF	1.62	6.73E-03
C5orf30	1.63	7.24E-04
MPP6	1.64	7.24E-04
SLC27A2	1.64	1.20E-03
HECTD2	1.64	1.26E-03
AK4	1.64	4.45E-03
KLHL31	1.64	7.67E-03
APBB2	1.64	8.87E-03
NIPA1	1.65	1.24E-04
OSBPL3	1.65	1.20E-03
CLUH	1.65	2.79E-03
TOMM40	1.65	3.08E-03
IPO4	1.65	3.40E-03
AFAP1L2	1.65	9.60E-03
ARSB	1.66	2.85E-04
TMEM2	1.66	2.85E-04
PUM3	1.66	2.28E-03
EHD4	1.66	3.73E-03
SRM	1.66	4.16E-03
PPAN	1.67	1.55E-03
TBX21	1.67	2.28E-03
ANKRD13B	1.67	5.59E-03
CEP170B	1.67	6.18E-03
URB2	1.68	1.28E-03
KCNK5	1.68	2.67E-03
PHLDA1	1.68	2.93E-03
TRPM2	1.68	3.42E-03
LINC00152	1.69	1.24E-04
TNF	1.69	2.49E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 0】

遺伝子	log2FC	FDR
SLC7A1	1.69	4.67E-03
KCTD15	1.69	9.42E-03
UCK2	1.70	1.82E-03
PROB1	1.70	1.97E-03
DYRK3	1.71	1.81E-03
CITED4	1.71	1.81E-03
DDX21	1.71	2.96E-03
CRTAM	1.71	6.63E-03
NLN	1.71	7.04E-03
MRC2	1.71	8.62E-03
IFRD2	1.72	1.96E-03
MRT04	1.72	2.36E-03
ATAD3A	1.72	2.55E-03
NEFH	1.72	2.68E-03
TRMT61A	1.72	3.35E-03
CELSR3	1.72	4.42E-03
ANKRD37	1.72	5.86E-03
LAG3	1.73	2.11E-03
YRDC	1.73	2.40E-03
BOP1	1.73	2.41E-03
ZNF593	1.73	2.99E-03
RBKS	1.73	3.29E-03
SOCS3	1.73	4.68E-03
KLHL35	1.73	8.06E-03
C4orf32	1.74	1.69E-03
SDC4	1.74	2.28E-03
DUSP4	1.74	3.22E-03
QPCT	1.74	6.42E-03
SERPINE2	1.74	8.28E-03
MPP1	1.75	5.04E-04
BYSL	1.75	1.54E-03
PAICS	1.75	2.79E-03
GADD45G	1.75	3.90E-03
SNHG4	1.75	3.90E-03
LRIG1	1.76	1.24E-04
COPRS	1.76	1.21E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 1】

遺伝子	log2FC	FDR
IL2RA	1.76	1.24E-03
CTNS	1.76	1.43E-03
RILP	1.76	4.87E-03
TUBB6	1.76	7.53E-03
VDR	1.77	9.86E-04
ARMC9	1.77	1.28E-03
CCDC86	1.77	2.12E-03
TBC1D4	1.78	1.43E-03
PRNP	1.78	1.54E-03
MICALCL	1.78	5.64E-03
CAMKK1	1.78	7.06E-03
BEND3	1.79	2.40E-03
CSF1	1.79	3.73E-03
PVR	1.80	1.02E-03
GNPDA1	1.80	1.40E-03
CTPS1	1.80	1.61E-03
RRP9	1.80	2.18E-03
C17orf51	1.80	5.64E-03
RAB20	1.80	7.84E-03
NEURL1	1.80	8.86E-03
NT5DC3	1.81	1.28E-03
MYC	1.81	2.71E-03
ADGRA3	1.81	2.87E-03
MIR222HG	1.81	2.99E-03
PLD6	1.81	3.68E-03
SLC1A5	1.83	6.10E-03
SLC3A2	1.84	4.25E-03
RP11-295D4.1	1.84	6.70E-03
HK2	1.85	1.34E-03
DERL3	1.85	1.85E-03
SLC35E4	1.86	7.24E-04
TMEM201	1.86	1.73E-03
METTL1	1.86	2.81E-03
LRP8	1.87	1.70E-03
PODXL2	1.87	1.80E-03
ECE2	1.87	2.97E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 2】

遺伝子	log2FC	FDR
BATF	1.87	4.81E-03
BCL2A1	1.88	7.27E-04
SLC38A5	1.88	2.00E-03
SMKR1	1.88	2.59E-03
AC002454.1	1.88	9.57E-03
CHSY1	1.89	1.24E-04
WARS	1.89	4.14E-03
RHPN2	1.89	4.99E-03
PTGFRN	1.89	5.30E-03
LAPTM4B	1.90	2.65E-03
AFAP1	1.92	3.11E-03
GFOD1	1.92	3.40E-03
FAM184A	1.92	5.78E-03
ZDHHC9	1.93	2.12E-03
SGK223	1.94	9.43E-04
NTRK1	1.94	1.78E-03
SEMA7A	1.95	2.12E-04
NETO2	1.95	1.85E-03
PUS7	1.95	3.02E-03
P3H3	1.95	6.06E-03
SLC17A9	1.96	4.43E-03
XCL1	1.97	3.97E-03
UBXN10	1.99	1.81E-03
RP11-19P22.8	1.99	6.71E-03
OTUD1	2.00	1.67E-04
RRP12	2.00	2.44E-03
SPINT1	2.02	6.25E-03
TSHZ3	2.04	9.11E-03
B4GALT2	2.05	5.24E-03
ODC1	2.06	1.88E-03
SLC39A14	2.06	2.55E-03
RPP25	2.07	1.31E-03
OXCT2	2.07	5.16E-03
CCR1	2.08	2.99E-03
HBEGF	2.08	3.51E-03
LINC01160	2.08	4.46E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 3】

遺伝子	log2FC	FDR
EGFL6	2.08	8.15E-03
MYO1E	2.09	1.03E-03
FASLG	2.09	1.20E-03
KIFC3	2.09	3.15E-03
MARVELD3	2.10	1.52E-03
NME1	2.10	2.87E-03
RHOB	2.10	3.88E-03
CCL3L3	2.10	5.45E-03
RP5-862P8.2	2.10	9.37E-03
RP11-803D5.1	2.11	1.72E-03
NR2F6	2.11	1.92E-03
CD160	2.11	2.09E-03
ZBTB32	2.11	5.53E-03
PALD1	2.11	7.38E-03
NDST1	2.12	8.78E-03
SPAG1	2.13	4.10E-04
CD109	2.13	1.09E-03
NEK6	2.13	2.16E-03
TNFRSF9	2.13	2.79E-03
OAF	2.13	7.10E-03
KCNH4	2.13	7.59E-03
ZEB2	2.14	1.24E-04
HES6	2.14	4.63E-03
ERRFI1	2.14	8.23E-03
C10orf128	2.15	9.43E-04
KCNQ5-IT1	2.15	7.75E-03
IRF4	2.16	1.72E-03
LTA	2.17	1.02E-03
GOLGA8N	2.17	9.15E-03
NDFIP2	2.19	1.94E-03
LINC00484	2.19	2.30E-03
HIVEP3	2.20	3.50E-04
FOSL2	2.20	1.96E-03
LRRC32	2.20	3.19E-03
IL4I1	2.21	1.26E-03
NR1D1	2.22	1.30E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 4】

遺伝子	log2FC	FDR
SLC7A5	2.23	2.85E-03
ANO7	2.24	1.69E-03
FABP5	2.24	1.78E-03
HBQ1	2.24	2.94E-03
CABP1	2.24	3.73E-03
RNF152	2.24	7.90E-03
PIP5K1B	2.25	1.48E-04
RDH10	2.25	8.72E-04
NAMPT	2.25	1.51E-03
RP11-290L1.3	2.25	2.41E-03
GOLGA8R	2.25	5.79E-03
NCR3LG1	2.25	6.89E-03
IL21	2.25	9.34E-03
SPHK1	2.26	2.80E-03
MIR3945HG	2.26	5.38E-03
AC058791.1	2.26	8.85E-03
CTD-2060L22.1	2.26	9.34E-03
ACVR1B	2.27	7.06E-03
SMN1	2.28	1.26E-03
RP11-680G24.6	2.28	4.71E-03
LUCAT1	2.28	5.32E-03
AC133644.2	2.29	7.48E-03
IER3	2.31	1.66E-03
PDGFA	2.31	2.41E-03
RP11-626G11.6	2.31	8.82E-03
IL17D	2.32	5.17E-03
AC005540.3	2.32	7.06E-03
SLC43A3	2.33	1.61E-03
RP11-932O9.9	2.33	7.07E-03
SLC35F3	2.33	8.13E-03
IRF8	2.34	1.13E-03
ACTN1	2.35	2.68E-03
SPR	2.35	3.40E-03
MIR4435-2HG	2.37	1.46E-04
RP11-132A1.4	2.37	9.97E-03
GRID2IP	2.38	1.66E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 5】

遺伝子	log2FC	FDR
MFSD2A	2.38	1.85E-03
FGF2	2.38	3.22E-03
TNIP3	2.38	4.35E-03
PDXP	2.38	5.78E-03
SMOX	2.42	7.27E-04
RP11-783K16.5	2.44	9.07E-03
HPDL	2.46	2.44E-03
MAF	2.49	1.28E-03
C17orf96	2.49	1.65E-03
SLC29A1	2.49	2.41E-03
AATK	2.49	9.23E-03
SOCS1	2.50	2.58E-03
RP11-254F7.4	2.50	6.79E-03
POU2AF1	2.51	1.57E-03
XCL2	2.51	1.76E-03
IL1RAP	2.52	7.98E-04
RP11-295P9.13	2.52	7.82E-03
SSC4D	2.53	3.71E-03
SHB	2.53	9.59E-03
CD3EAP	2.54	1.57E-03
SH2D4A	2.54	4.25E-03
STAB1	2.54	8.18E-03
SAMD4A	2.57	9.79E-03
CEACAM1	2.58	1.24E-03
SIGLEC6	2.58	7.48E-03
CRIM1	2.59	2.85E-04
LINC00843	2.62	4.63E-03
SLC4A4	2.63	1.28E-03
PACSIN3	2.63	5.62E-03
ARFGEF3	2.66	2.41E-03
RP11-542M13.3	2.66	3.56E-03
CCL4L2	2.68	1.85E-03
SMAD1	2.70	9.03E-03
SETBP1	2.71	2.28E-03
KIR3DX1	2.71	2.41E-03
RP11-863P13.4	2.71	2.49E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 6】

遺伝子	log2FC	FDR
BATF3	2.71	5.26E-03
PDCD1	2.72	6.77E-04
CTC-251I16.1	2.72	2.40E-03
OSBPL6	2.72	9.92E-03
HSD11B1	2.74	1.35E-03
RP11-47I22.2	2.74	6.96E-03
BICC1	2.75	4.35E-03
RP11-843B15.4	2.77	5.95E-03
BANK1	2.77	8.35E-03
LDHAL6B	2.77	8.79E-03
GZMB	2.78	1.03E-03
PTGIS	2.78	6.57E-03
RP11-172H24.4	2.78	9.11E-03
C22orf42	2.79	1.33E-03
AP001189.4	2.79	3.99E-03
CD200	2.81	7.73E-04
C10orf67	2.82	6.12E-03
RP11-822E23.8	2.83	6.77E-03
CSF2	2.84	1.28E-03
DUSP6	2.84	1.76E-03
RP13-512J5.1	2.87	7.09E-03
CTTN	2.94	7.05E-04
RP11-1000B6.3	2.98	5.99E-03
TNFRSF21	2.99	9.99E-04
KIAA1217	2.99	1.82E-03
FOSL1	3.00	5.91E-04
PLAU	3.02	1.81E-03
ARHGAP42	3.02	2.73E-03
IGHV1-3	3.03	4.14E-03
RP11-77K12.1	3.03	8.98E-03
PRKAG2-AS1	3.04	6.18E-03
AP001046.5	3.06	3.19E-03
SPRY4	3.07	6.03E-04
GNG12	3.08	6.72E-03
SHC4	3.09	3.26E-04
MAFG-AS1	3.09	3.15E-03

10

20

30

40

【表 3 - 4 7】

遺伝子	log2FC	FDR
LINC00892	3.10	7.24E-04
TNFSF11	3.11	2.14E-03
CYSLTR2	3.13	1.08E-03
RP11-70D24.2	3.13	6.44E-03
KITLG	3.13	7.06E-03
CCL3	3.16	3.40E-04
IL4	3.16	3.92E-03
TNS3	3.18	6.03E-04
FZD9	3.18	1.70E-03
IL22	3.18	3.29E-03
HRH2	3.19	9.43E-04
PRDM13	3.22	3.04E-03
CCL4	3.23	3.55E-04
TEX19	3.24	5.71E-03
IL1RL1	3.26	2.77E-03
CD40LG	3.29	3.51E-04
PLPP2	3.29	1.28E-03
FGF9	3.29	4.55E-03
IL2	3.30	2.36E-03
RP11-505K9.5	3.34	1.52E-03
NCS1	3.34	3.20E-03
XIRP1	3.36	4.07E-04
CIART	3.37	9.43E-04
GLDC	3.44	2.36E-03
G0S2	3.50	4.19E-03
ASCL2	3.54	6.37E-03
IFNG	3.56	4.38E-04
CD276	3.61	5.05E-03
FLT1	3.62	1.72E-03
GNAI1	3.62	3.15E-03
TRIM6	3.72	2.96E-03
RP11-1079K10.4	3.72	3.13E-03
AC017002.1	3.73	2.18E-03
SIPA1L2	3.75	7.27E-04
KCNJ11	3.84	5.04E-04
RP11-456K23.1	3.87	7.27E-04

10

20

30

40

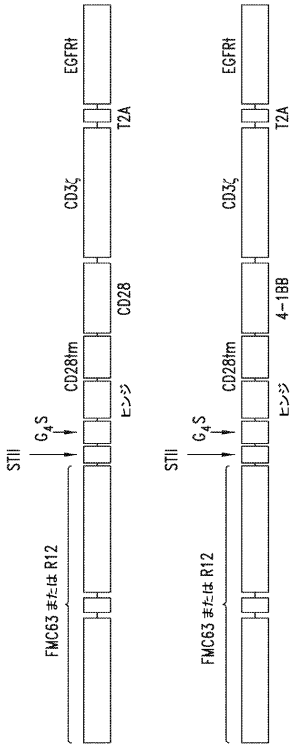
【表 3 - 4 8】

遺伝子	log2FC	FDR
KCNG1	3.88	6.31E-03
INSM1	3.93	4.97E-03
F5	3.94	9.16E-04
TFEC	3.95	7.21E-04
GOLGA80	4.09	6.12E-03
PRSS23	4.18	2.85E-04
HRH1	4.36	3.14E-03
GPR87	4.38	1.02E-03
EMP1	4.53	2.85E-04
ZBED2	4.68	8.52E-07
IL3	4.87	8.66E-03
IL31	5.14	3.34E-03
IGF2	5.29	4.10E-04
IL10	5.58	6.25E-03

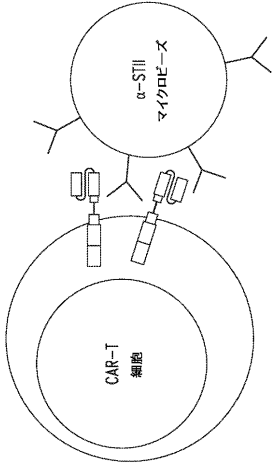
10

20

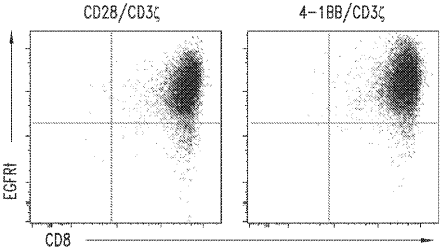
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 1 C】



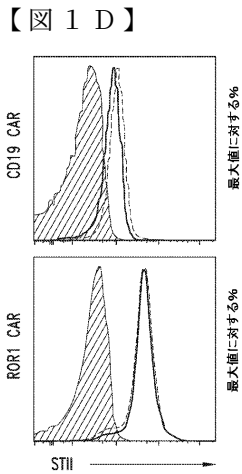


FIG. 1D

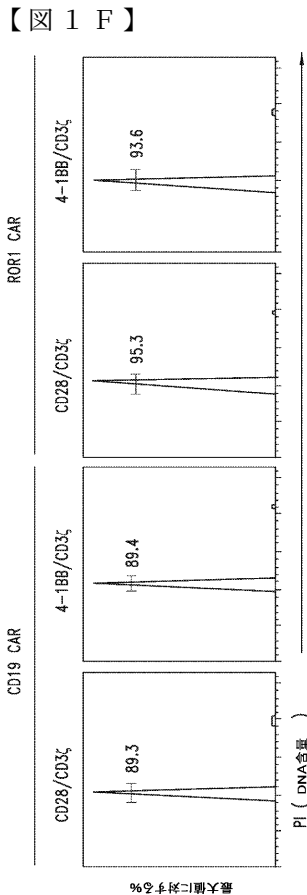


FIG. 1F

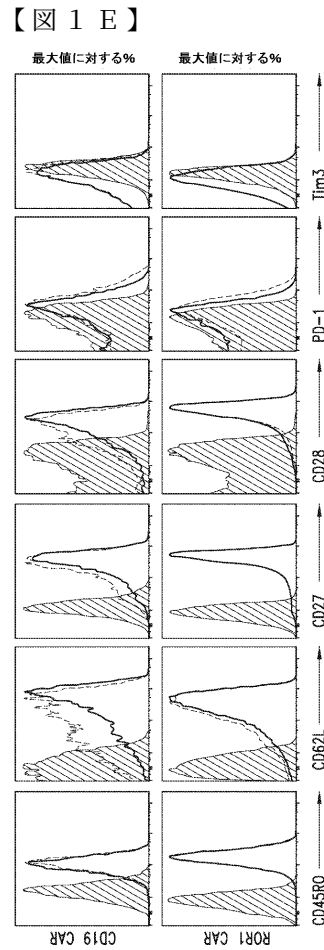


FIG. 1E

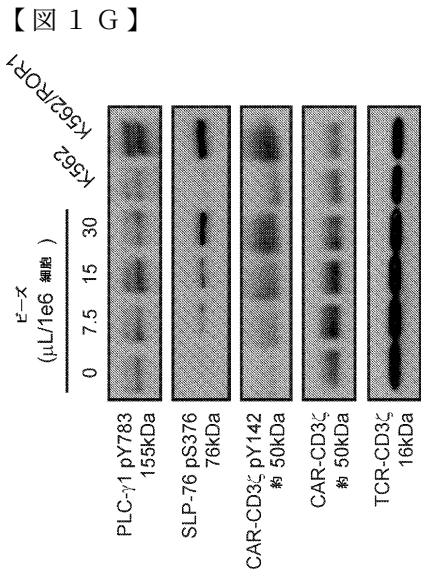


FIG. 1G

【図 2 - 1】

実験	ドナー	scFv 特異性
1	JD	CD19
2	JD	ROR1
3	JB	CD19

FIG. 2B

シグナル伝達ドメイン	時間	処置
CD28/CD3 ζ	10 分	刺激
		対照
	45 分	刺激
		対照
4-1BB/CD3 ζ	10 分	刺激
		対照
	45 分	刺激
		対照

FIG. 2A

【図 2 - 3】

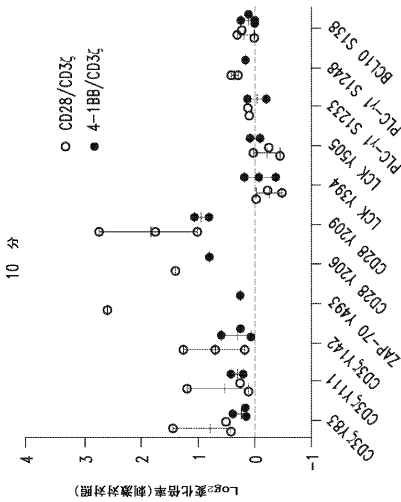


FIG. 2E

【図 2 - 2】

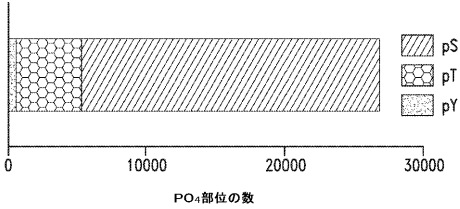


FIG. 2C

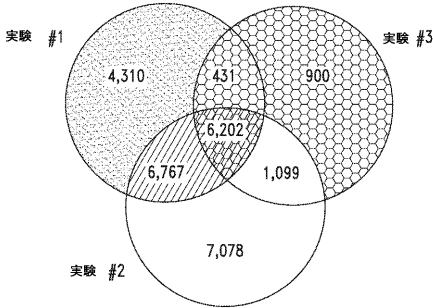


FIG. 2D

【図 2 - 4】

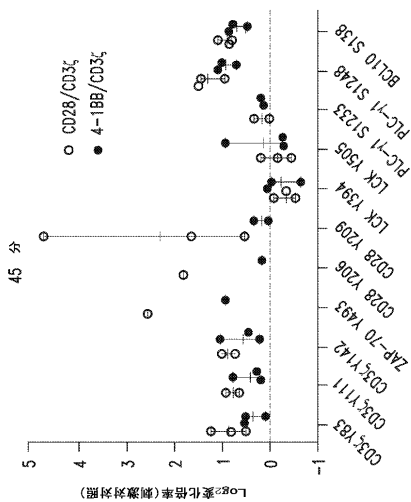


FIG. 2F

【 図 2 - 5 】

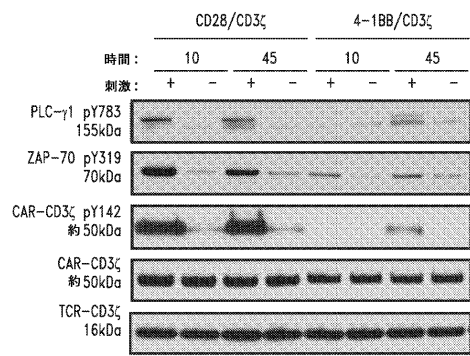


FIG. 2G

【 図 3 A 】

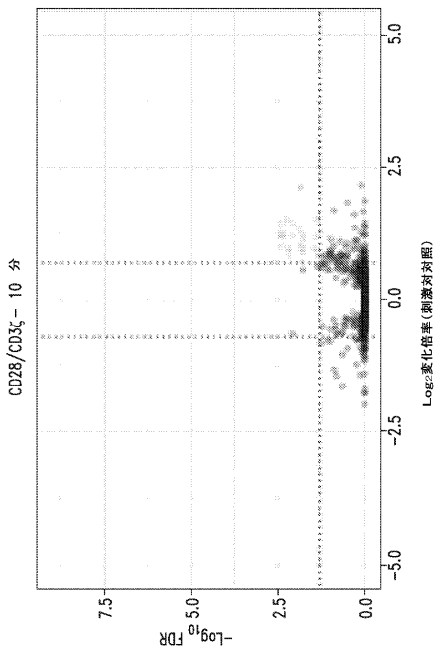


FIG. 3A

【 図 3 B 】

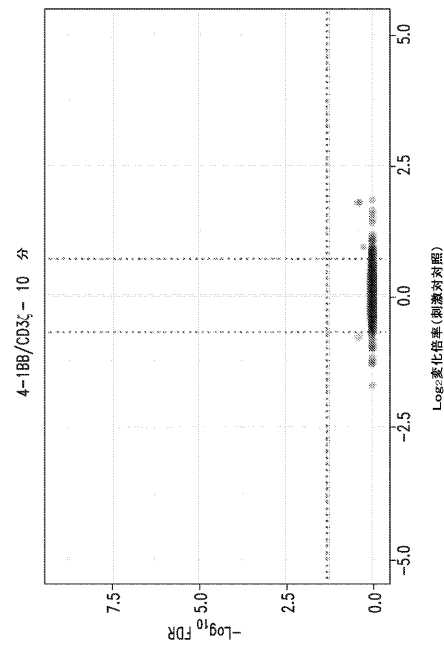


FIG. 3B

【 図 3 C 】

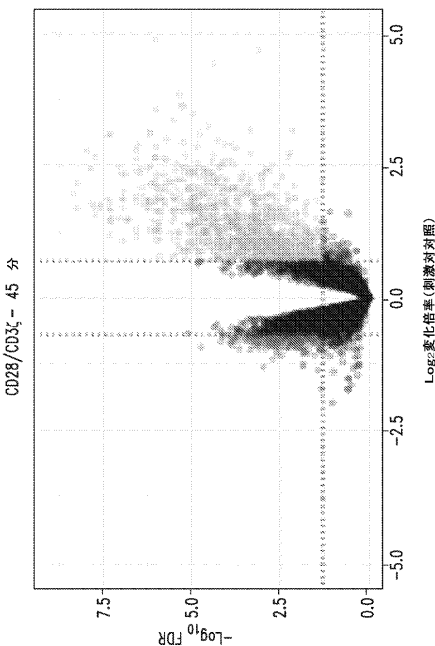


FIG. 3C

【図 3 D】

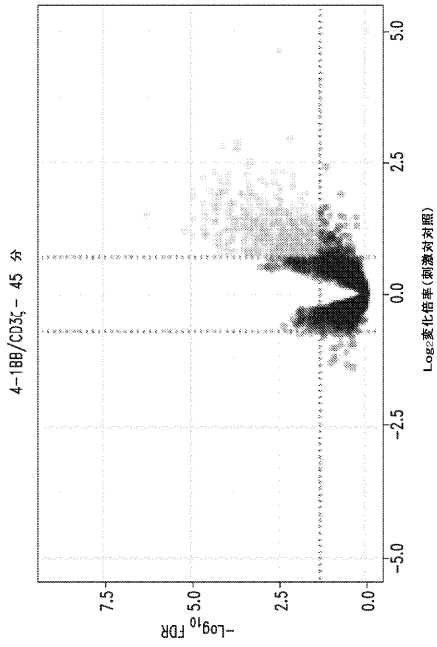


FIG. 3D

【図 3 E】

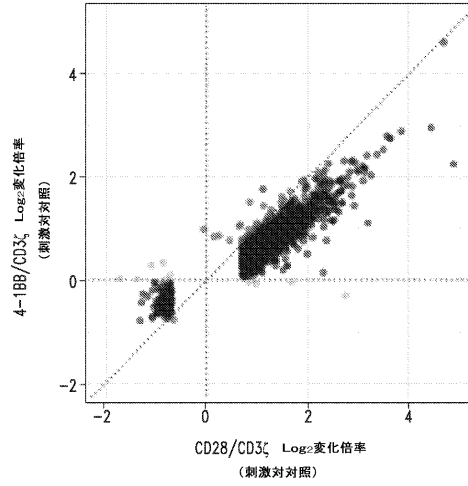


FIG. 3E

【図 3 F】

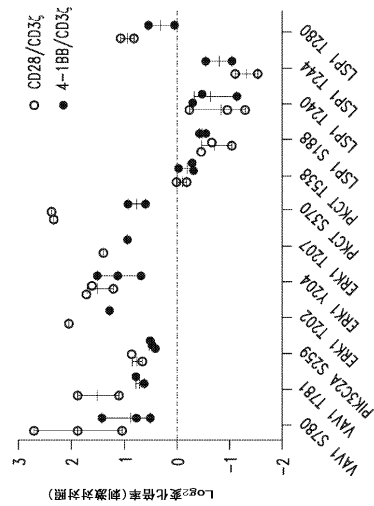


FIG. 3F

【図 4】

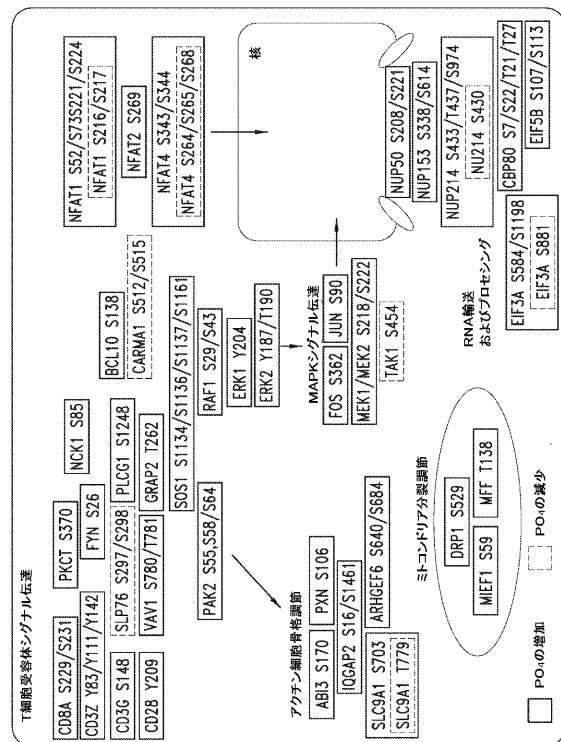


FIG. 4

【図 5 - 1】

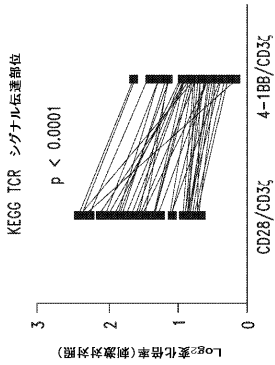


FIG. 5B

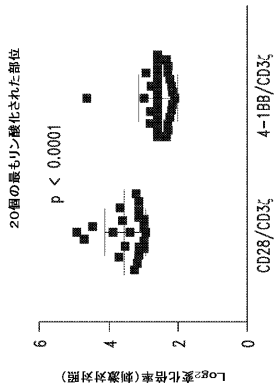


FIG. 5A

【図 6 - 1】

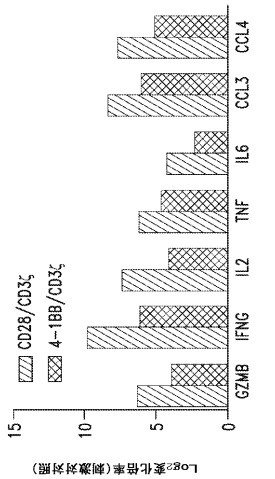


FIG. 6B

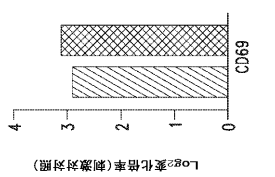


FIG. 6A

【図 5 - 2】

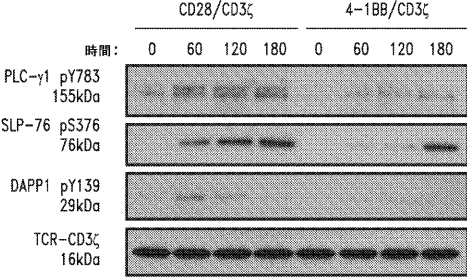


FIG. 5C

【図 6 - 2】

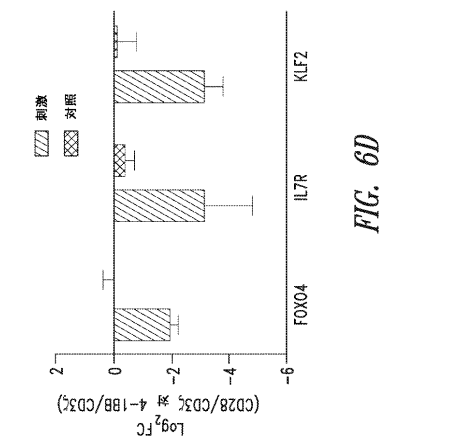


FIG. 6D

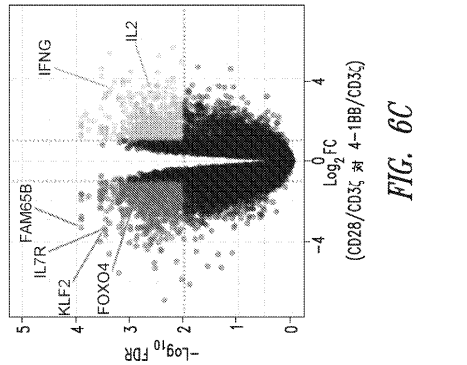


FIG. 6C

【図 6 - 3】

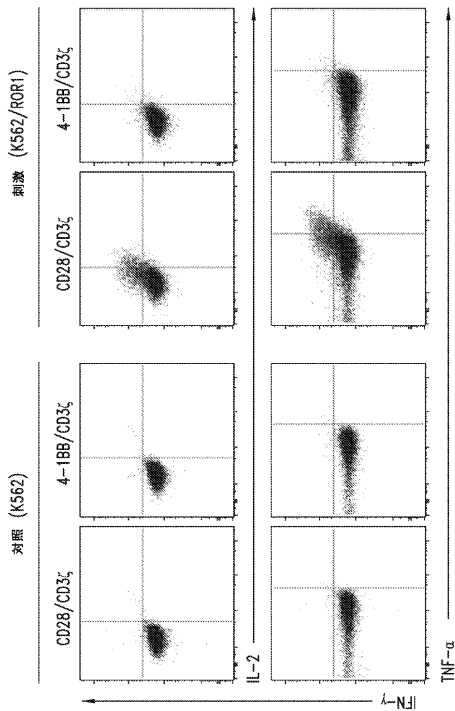


FIG. 6E

【図 6 - 4】

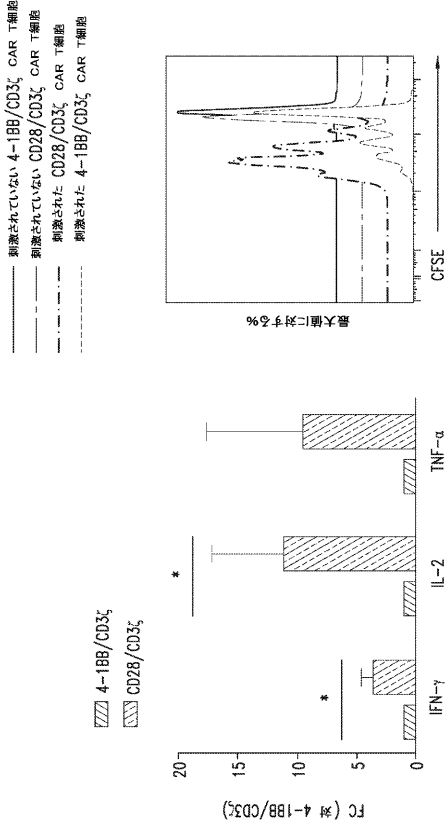


FIG. 6G

【図 6 - 5】

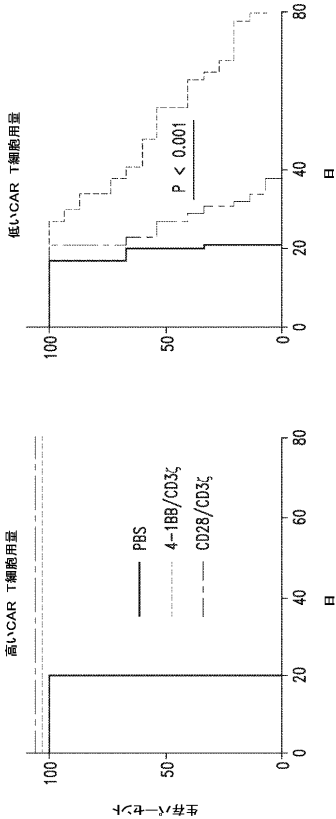


FIG. 6H

【図 6 - 6】

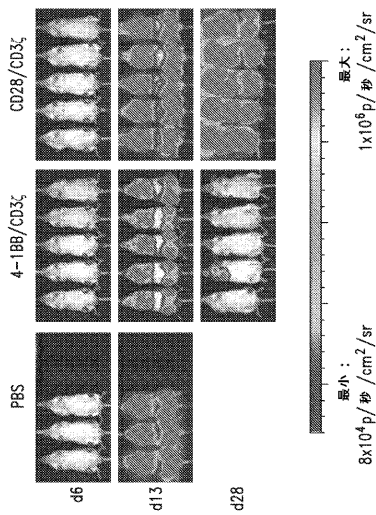


FIG. 6I

【図 6-7】

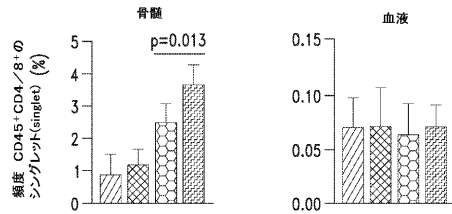


FIG. 6J

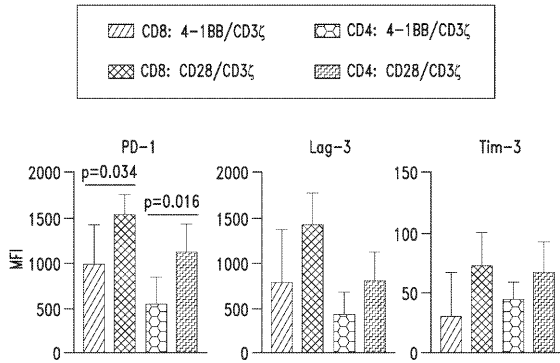


FIG. 6K

【図 7-2】

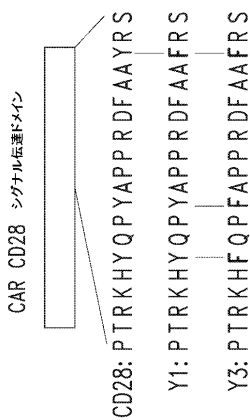
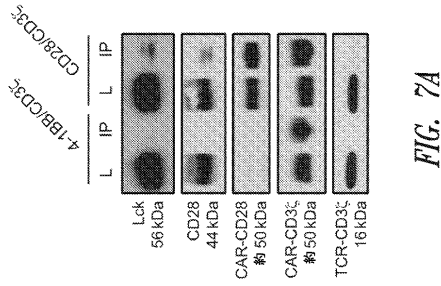
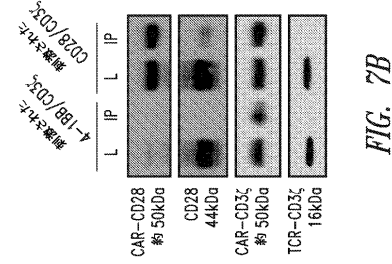


FIG. 7C

【図 7-1】



【図 7-3】

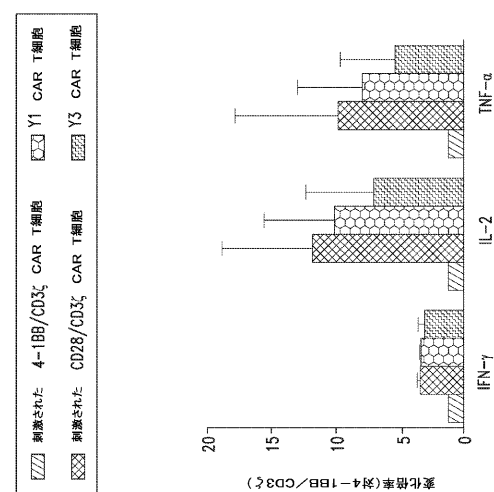


FIG. 7E

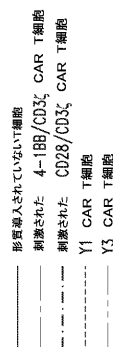


FIG. 7D

【図 7 - 4】

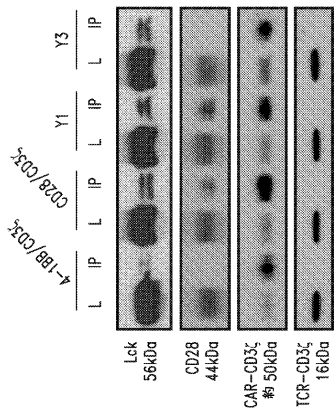


FIG. 7F

【図 7 - 5】

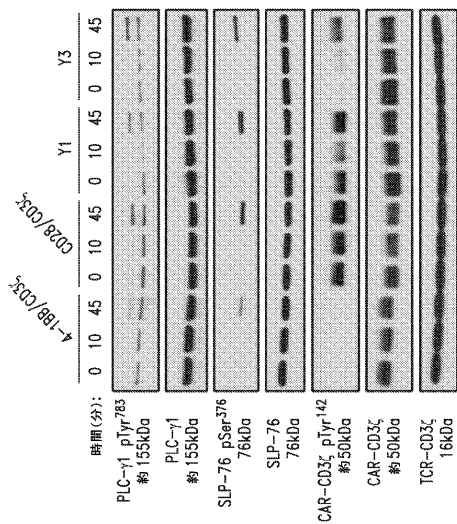


FIG. 7G

【図 7 - 6】

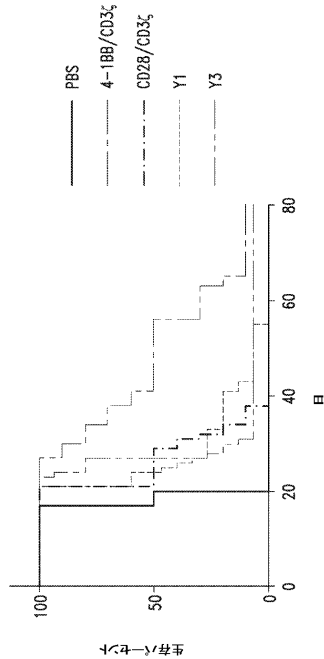


FIG. 7H

【図 8 A】

細胞型	時間	処置
初代T細胞	10分	OKT3 + α -マウス IgG
		α -マウス IgG
	45分	OKT3 + α -マウス IgG
		α -マウス IgG
Jurkat 細胞	10分	OKT3 + α -マウス IgG
		α -マウス IgG
	45分	OKT3 + α -マウス IgG
		α -マウス IgG

FIG. 8A

【 図 8 B 】

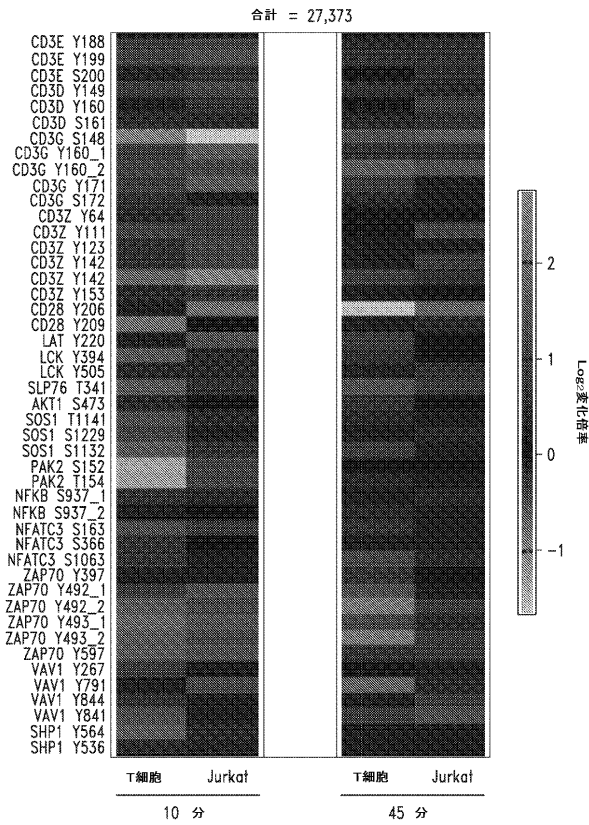


FIG. 8B

【図 9】

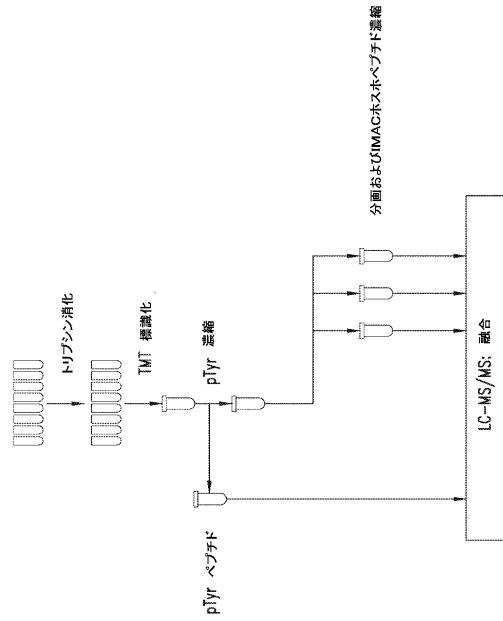


FIG. 9

【图 10】

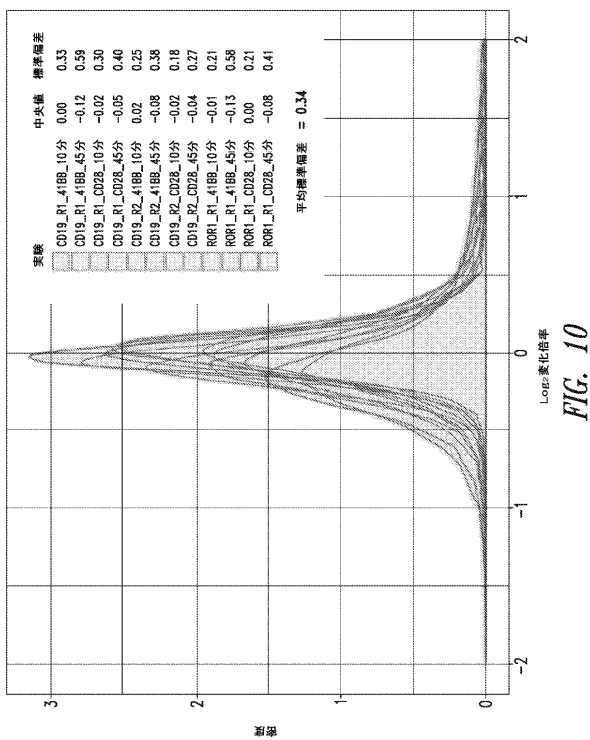


FIG. 10

【図 1 1 - 1】

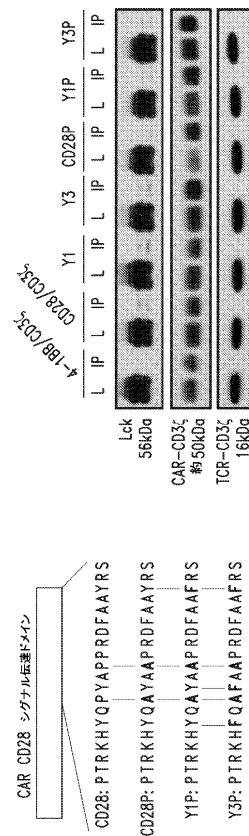


FIG. 11A

FIG. 11B

【図 1 1 - 2】

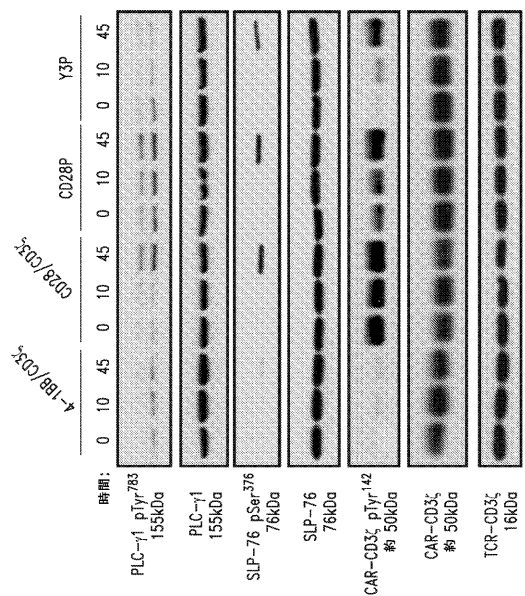


FIG. 11C

【図 1 1 - 3】

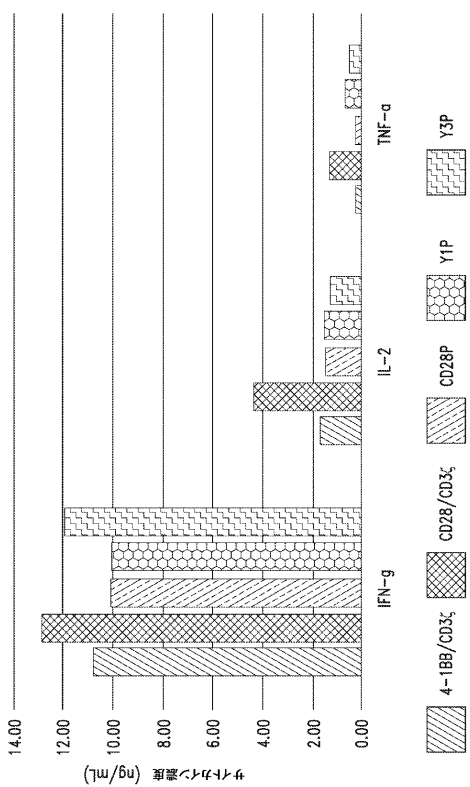


FIG. 11D

【配列表】

2021514631000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/019014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/705 C07K14/725
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/105522 A1 (FORMAN STEPHEN J [US]; BROWN CHRISTINE E [US] ET AL.) 16 July 2015 (2015-07-16)	1,19,20, 22-28, 31-33, 36-41, 43,44, 46-54, 61-65, 67-70
A	paragraphs [0056], [0057], [0084]; claims ----- WO 95/10628 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 20 April 1995 (1995-04-20) figure 7 ----- -/--	1-70

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 April 2019

Date of mailing of the international search report

10/05/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/019014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2018/140725 A1 (NOVARTIS AG [CH]; UNIV PENNSYLVANIA [UA]) 2 August 2018 (2018-08-02) the whole document	1-70
X,P	----- RAMELLO M C ET AL: "Novel phosphorylation sites in the CD28 costimulatory domain shape CAR-T cell function", MOLECULAR THERAPY 20180501 CELL PRESS NLD, vol. 26, no. 5, Supplement 1, 1 May 2018 (2018-05-01), XP002790611, ISSN: 1525-0024 abstract	1-70
E	----- WO 2019/060174 A1 (H LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RES INSTITUTE INC [US]) 28 March 2019 (2019-03-28) the whole document	1-70
T	----- BOUCHER JUSTIN C ET AL: "Mutation of the CD28 costimulatory domain confers increased CAR T cell persistence and decreased exhaustion(57.28)", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 200, no. 1, Suppl. S, 1 May 2018 (2018-05-01), page 5PP, XP002790612, & ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-OF-IMMUNOLOGISTS (AAI); AUSTIN, TX, USA; MAY 04 -08, 2018	
T	----- SALTER ALEXANDER I ET AL: "Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function", SCIENCE SIGNALING, vol. 11, no. 544, 21 August 2018 (2018-08-21), XP009512675, -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/019014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015105522 A1	16-07-2015	AU 2014376328 A1 CA 2936501 A1 CN 107074957 A EP 3094653 A1 JP 2017507919 A US 2016333108 A1 WO 2015105522 A1	21-07-2016 16-07-2015 18-08-2017 23-11-2016 23-03-2017 17-11-2016 16-07-2015
WO 9510628 A2	20-04-1995	US 5525503 A WO 9510628 A2	11-06-1996 20-04-1995
WO 2018140725 A1	02-08-2018	NONE	
WO 2019060174 A1	28-03-2019	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	C 0 7 K 14/71	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 0 0
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	A
	C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 62/739,792

(32)優先日 平成30年10月1日(2018.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ソルター, アレクサンダー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2, シアトル, イェール アベニュー イー 2 3 3
7 ビー

(72)発明者 リデル, スタンリー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5, サマミッシュ, 2 6 8 ティーエイチ プレイス
エスイー 1 7 6 3

Fターム(参考) 4B029 AA23 BB11 BB16 BB20

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05

4B065 AA93Y AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA01 AA02 AA13 AA19 BA01 BA19 BA20 BA23 CA53 NA05

ZB26 ZB27 ZC02 ZC75

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA04 NA05 ZB26 ZB27 ZC02

ZC75
4C087 AA01 AA02 BB63 MA02 NA05 ZB26 ZB27 ZC02 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA22
EA28 EA29 FA74