

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2024-527997  
(P2024-527997A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード ( 参考 )	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B 0 6 5
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C 0 8 4
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		4 C 0 8 7
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 ( 全95頁 ) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-505066(P2024-505066)	(71)出願人	503115205
(86)(22)出願日	令和4年7月28日(2022.7.28)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85)翻訳文提出日	令和6年3月25日(2024.3.25)		ザ レランド スタンフォード ジュニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074251		ユニバーシティー
(87)国際公開番号	WO2023/010073		アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8
(87)国際公開日	令和5年2月2日(2023.2.2)		カリフォルニア州 スタンフォード メイ
(31)優先権主張番号	63/226,559		ン クワッド ビルディング 1 7 0 サード
(32)優先日	令和3年7月28日(2021.7.28)		フロア ピー . オー . ボックス 2 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		3 8 6 オフィス オブ ザ ジェネラル
			カウンセル
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	110001173
			弁理士法人川口国際特許事務所
		(72)発明者	サトバシー , アンスマン
			アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4
			3 0 5 - 2 0 3 8、スタンフォード、ピ
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞持続性及び機能を改善するための組成物及び方法

(57)【要約】

T細胞疲弊において役割を果たす遺伝子を取り除くように改変されたT細胞を含む組成物、並びに組成物及びその方法が本明細書で提供される。INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠く操作されたT細胞が提供される。INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質及びSWI/SNFファミリーメンバー(例えば、BAF複合体タンパク質)を含む、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を欠く操作されたT細胞も提供される。対象において疾患又は障害を治療する方法であって、操作されたT細胞の投与を含む方法が提供される。操作されたT細胞の疲弊を予防するための方法、治療T細胞を作製する方法、及びT細胞疲弊において役割を果たす遺伝子を同定する方法も提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1 及び ACTR8 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子を欠く操作された T 細胞。

**【請求項 2】**

INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1 及び ACTR8 からなる群から選択される 2 つ以上の遺伝子を欠く、請求項 1 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 3】**

少なくとも 1 つのクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠く操作された T 細胞。

**【請求項 4】**

2 つ以上のクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠く、請求項 3 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 5】**

少なくとも 1 つのクロマチン再構成タンパク質が、INO80 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又は SWI/SNF ファミリーメンバー、又はその組合せである、請求項 3 又は 4 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 6】**

INO80 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質が、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである、請求項 5 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 7】**

SWI/SNF ファミリーメンバーが、cBAF 複合体のメンバーである、請求項 5 又は 6 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 8】**

SWI/SNF ファミリーメンバーが、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smardc1、Smardc2、Smardc4、Smardcc1、又はその組合せである、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の操作された T 細胞。

**【請求項 9】**

GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1 及び ELMSAN1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子をさらに欠く、請求項 3 ~ 8 のいずれかに記載の操作された T 細胞。

**【請求項 10】**

操作されていない T 細胞が疲弊を表す条件下で、機能性を維持する、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の操作された T 細胞。

**【請求項 11】**

外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の操作された T 細胞。

**【請求項 12】**

外来性受容体が、T 細胞受容体 (TCR) 又はキメラ抗原受容体 (CAR) である、請求項 11 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 13】**

外来性受容体が、腫瘍抗原に特異的である、請求項 11 又は 12 に記載の操作された T 細胞。

**【請求項 14】**

T 細胞が、対象由来の生体試料に由来する、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の操作された T 細胞。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

T細胞が、腫瘍試料から単離される、請求項14に記載の操作されたT細胞。

【請求項16】

T細胞が、エクスピボで拡大増殖される、請求項1～15のいずれかに記載の操作されたT細胞。

【請求項17】

請求項1～16のいずれかの操作されたT細胞の集団を含む組成物。

【請求項18】

少なくとも1つの治療薬をさらに含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

少なくとも1つの治療薬が、T細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択される、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

治療T細胞を作製する方法であって、  
T細胞を含む試料を入手するステップ；  
T細胞のDNAを変化させて、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ；及び  
T細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップを含む方法。

【請求項21】

治療T細胞を作製する方法であって、  
T細胞を含む試料を入手するステップ；  
T細胞のDNAを変化させて、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ；及び  
T細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップを含む方法。

【請求項22】

少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質が、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又はSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質が、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

SWI/SNFファミリーメンバーが、cBAF複合体のメンバーである、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項25】

SWI/SNFファミリーメンバーが、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarrcc1、又はその組合せである、請求項22～24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】

T細胞のDNAを変化させて、GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1及びELMSAN1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップをさらに含む、請求項21～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

T細胞が、対象由来である、請求項20～26のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 28】

T細胞が、腫瘍試料から単離される、請求項 20～27のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 29】

T細胞をエクスピボで拡大増殖することをさらに含む、請求項 27又は28に記載の方法。

## 【請求項 30】

外来性受容体が、T細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)である、請求項 20～29のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 31】

外来性受容体が、腫瘍抗原に特異的である、請求項 30に記載の方法。

10

## 【請求項 32】

DNAを変化させることが、T細胞の疲弊を予防する又は減少させる、請求項 20～31のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 33】

対象において疾患又は障害を治療するための方法であって、請求項 1～16のいずれかに記載の操作されたT細胞又は請求項 17～19のいずれかに記載の組成物の有効量を対象に投与することを含む方法。

## 【請求項 34】

疾患又は障害が、感染症又はがんを含む、請求項 33に記載の方法。

## 【請求項 35】

がんが、腫瘍を含む、請求項 34に記載の方法。

20

## 【請求項 36】

投与が、対象におけるがん細胞の数を減少させる、請求項 33～35のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 37】

投与が、対象における腫瘍量を減少させる及び／又は除去させる、請求項 33～36のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 38】

投与が、非改変T細胞の投与と比べて増強されたがん治療を示す、請求項 33～37のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 39】

少なくとも1つの追加の治療薬を投与することをさらに含む、請求項 33～38のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 40】

少なくとも1つの治療薬が、T細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択される、請求項 39に記載の方法。

## 【請求項 41】

操作されたT細胞が、対象にとって自己由来である、請求項 33～40のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 42】

操作されたT細胞が、操作されていないT細胞が疲弊を表す条件下で機能性を維持する、請求項 33～41のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 43】

操作されたT細胞が、操作されていないT細胞と比べて改善された持続性及び機能を有する、請求項 33～42のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 44】

T細胞疲弊を予防する方法であって、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝

50

子改変することを含む方法。

【請求項 45】

T細胞疲弊を予防する方法であって、少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することを含む方法。

【請求項 46】

少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質が、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又はSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質が、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである、請求項46に記載の方法。

【請求項 48】

SWI/SNFファミリーメンバーが、cBAF複合体のメンバーである、請求項46又は47に記載の方法。

【請求項 49】

SWI/SNFファミリーメンバーが、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smrca1、Smrca2、Smrca4、Smrcc1、又はその組合せである、請求項46～48のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

T細胞のDNAを変化させて、GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1及びELMSAN1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップをさらに含む、請求項46～49のいずれかに記載の方法。

【請求項 51】

T細胞が、外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含む、請求項44～50のいずれかに記載の方法。

【請求項 52】

外来性受容体が、T細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)である、請求項51に記載の方法。

【請求項 53】

外来性受容体が、腫瘍抗原に特異的である、請求項51又は52に記載の方法。

【請求項 54】

T細胞が、慢性抗原の存在下で増加した生存を有する、請求項44～53のいずれかに記載の方法。

【請求項 55】

T細胞をそれを必要とする対象に投与することをさらに含む、請求項44～54のいずれかに記載の方法。

【請求項 56】

対象が、がん又は感染性疾患を有する、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

T細胞疲弊を促進する遺伝子を求めてスクリーニングする方法であって、慢性又は急性刺激の条件下で少なくとも6日間T細胞を培養するステップであって、T細胞のそれぞれが少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンを含む、ステップ；  
疲弊T細胞表面表現型を示していないT細胞を単離するステップ；及び  
少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンを同定するステップを含む方法。

【請求項 58】

T細胞が、T細胞ライブラリーであり、T細胞ライブラリーが、T細胞のゲノム中のそ

10

20

30

40

50

れぞれの遺伝子についてノックアウト又はノックダウンを有する少なくとも 1 つの T 細胞を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

T 細胞が、それぞれの細胞が目的の遺伝子に向けられた少なくとも 1 つのガイド RNA を含む CRISPR - Cas システムを使用して作製される、請求項 57 又は 58 に記載の方法。

【請求項 60】

T 細胞が、CD8 + T 細胞である、請求項 57 ~ 59 のいずれかに記載の方法。

【請求項 61】

T 細胞が、対象から単離される、請求項 57 ~ 60 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 62】

慢性刺激の条件が、抗 CD3 被覆プレートを使用して T 細胞を培養することを含む、請求項 57 ~ 61 のいずれかに記載の方法。

【請求項 63】

慢性刺激の条件が、T 細胞を IL - 2 を用いて培養することをさらに含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

急性刺激の条件は、T 細胞を IL - 2 を用いて培養することを含む、請求項 57 ~ 63 のいずれかに記載の方法。

【請求項 65】

培養が、6 ~ 10 日間続く、請求項 57 ~ 64 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 66】

疲弊 T 細胞表面表現型が、TIM - 3 及び PD - 1 の増加した濃度を含む、請求項 57 ~ 65 のいずれかに記載の方法。

【請求項 67】

対象において疾患若しくは障害を治療するための、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の操作された T 細胞又は請求項 17 ~ 19 のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項 68】

疾患又は障害が、感染症又はがんを含む、請求項 67 に記載の使用。

【請求項 69】

がんが、腫瘍を含む、請求項 68 に記載の使用。

30

【請求項 70】

対象中のがん細胞の数が減少する、請求項 67 ~ 69 のいずれかに記載の使用。

【請求項 71】

対象中の腫瘍負荷が、減少するか、及び / 又は取り除かれる、請求項 67 ~ 70 のいずれかに記載の使用。

【請求項 72】

使用が、非改変 T 細胞の使用と比べて増強されたがん治療を示す、請求項 67 ~ 71 のいずれかに記載の使用。

【請求項 73】

少なくとも 1 つの追加の治療薬をさらに含む、請求項 67 ~ 72 のいずれかに記載の使用。

40

【請求項 74】

少なくとも 1 つの治療薬が、T 細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択される、請求項 73 に記載の使用。

【請求項 75】

操作された T 細胞が、対象にとって自己由来である、請求項 67 ~ 74 のいずれかに記載の使用。

【請求項 76】

50

操作された T 細胞が、操作されていない T 細胞が疲弊を表す条件下で機能性を維持する、請求項 67 ~ 75 のいずれかに記載の使用。

【請求項 77】

操作された T 細胞が、非改変 T 細胞と比べて改善された持続性及び機能を有する、請求項 67 ~ 76 のいずれかに記載の使用。

【請求項 78】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の操作された T 細胞又は T 細胞を遺伝子操作するためのシステムを含む、システム若しくはキット。

【請求項 79】

T 細胞を遺伝子操作するためのシステムが、クラスター化分散性短鎖反復回文配列 (C R I S P R) / C R I S P R - 関連タンパク質 (C a s) システムを含む、請求項 78 に記載のシステム又はキット。 10

【請求項 80】

T 細胞を遺伝子操作するためのシステムが、C a s 9、又は C a s 9 をコードする核酸、及び T 細胞疲弊を促進する少なくとも 1 つの遺伝子に向けられた g R N A、又は g R N A をコードする核酸を含む、請求項 78 又は 79 に記載のシステム又はキット。

【請求項 81】

少なくとも 1 つの遺伝子が、I N O 8 0 C、G A T A 3、A R I D 1 A、W D R 8 2、T R P 5 3、G P R 1 3 7 C、Z F P 2 1 9、H D A C 1、E L M S A N 1 及び A C T R 8 からなる群から選択される、請求項 80 に記載のシステム又はキット。 20

【請求項 82】

少なくとも 1 つの遺伝子が、クロマチン再構成タンパク質をコードする、請求項 80 に記載のシステム又はキット。

【請求項 83】

少なくとも 1 つのクロマチン再構成タンパク質が、I N O 8 0 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又は S W I / S N F ファミリーメンバー、又はその組合せである、請求項 82 に記載のシステム又はキット。

【請求項 84】

I N O 8 0 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質が、A c t r 5、I n o 8 0、I n o 8 0 c、I n o 8 0 b、A c t r 8、又はその組合せである、請求項 83 に記載のシステム又はキット。 30

【請求項 85】

S W I / S N F ファミリーメンバーが、c B A F 複合体のメンバーである、請求項 83 又は 84 に記載のシステム又はキット。

【請求項 86】

S W I / S N F ファミリーメンバーが、A r i d 1 a、A r i d 2、A r i d 1 b、S m a r c b 1、S m a r c d 2、S m a r c a 4、S m a r c c 1、又はその組合せである、請求項 83 ~ 85 のいずれかに記載のシステム又はキット。

【請求項 87】

外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含む、請求項 78 ~ 86 のいずれかに記載のシステム又はキット。 40

【請求項 88】

少なくとも 1 つの追加の治療薬をさらに含む、請求項 78 ~ 87 のいずれかに記載のシステム又はキット。

【請求項 89】

少なくとも 1 つの治療薬が、T 細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択される、請求項 88 に記載のシステム又はキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【 0 0 0 1 】

本出願は、2021年7月28日提出の米国特許仮出願第63/226,559号の利益を主張するものであり、前記特許文献の内容は参照によりその全体を本明細書に組み込む。

## 【 0 0 0 2 】

本開示は、改変T細胞並びにその組成及び使用方法に関する。

## 【 0 0 0 3 】

配列表陳述

(STDU2-39684-601.xml; サイズ: 7,214 バイト; 及び作成日: 2022年7月28日) という標題の電子配列表の内容は、参照によりその全体を本明細書に組み込む。 10

## 【 0 0 0 4 】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所により与えられた認可番号CA230188下での政府支援により行われた。政府は本発明にある特定の権利を有する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 5 】

T細胞疲弊の進展は、特に固形腫瘍に対する永続的及び効果的CAR-T細胞療法にとって大きな障壁である。がんが認識されると、腫瘍細胞による慢性T細胞活性化はT細胞疲弊をもたらし、そのために増殖、細胞傷害性、及びエフェクター機能が損なわれ、それによってがん細胞のT細胞殺傷が制限される。疲弊はチェックポイント阻害剤を用いて標的にされることが多い。しかし、大多数の患者がこれらの薬剤に応答せず、臨床試験においてCAR-T細胞と組み合わせても何の有効性も示されていない。 20

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 6 】

(要旨)

T細胞持続性及び機能性を促進する又は支持する少なくとも1つの遺伝子を欠く操作されたT細胞が本明細書で提供される。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、操作されていないT細胞が疲弊を見せる条件下で機能性を維持する。 30

## 【 0 0 0 7 】

一部の実施形態では、操作されたT細胞は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠く。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される2つ以上の遺伝子を欠く。

## 【 0 0 0 8 】

一部の実施形態では、操作されたT細胞は、少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質(chromatin remodeling protein)又はそれをコードする遺伝子を欠く。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、2つ以上のクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠く。一部の実施形態では、少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質(nucleosome positioning complex protein)又はSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、CBAF(カノニカルBRG1/BRM会合因子)複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smrca1、Smrca2、Sma 40 50

r c a 4、S m a r c c 1、又はその組合せである。一部の実施形態では、操作された T 細胞は、G A T A 3、W D R 8 2、T R P 5 3、G P R 1 3 7 C、Z F P 2 1 9、H D A C 1 及び E L M S A N 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子をさらに欠く。

【 0 0 0 9 】

操作された T 細胞は、外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含みうる。一部の実施形態では、外来性受容体は T 細胞受容体 ( T C R ) 又はキメラ抗原受容体 ( C A R ) である。一部の実施形態では、外来性受容体は腫瘍抗原に特異的である。

【 0 0 1 0 】

一部の実施形態では、T 細胞は対象由来の生体試料に由来する。一部の実施形態では、T 細胞は腫瘍試料から単離される。一部の実施形態では、T 細胞はエキスピボで拡大増殖される。

【 0 0 1 1 】

本明細書に記載される操作された T 細胞の集団を含む組成物も本明細書で提供される。組成物は、少なくとも 1 つの治療薬をさらに含みうる。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの治療薬は、T 細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択される。

【 0 0 1 2 】

治療 T 細胞を作製する方法が本明細書でさらに提供される。一部の実施形態では、方法は、T 細胞を含む試料を入手するステップ；T 細胞の D N A を変化させて、I N O 8 0 C、G A T A 3、A R I D 1 A、W D R 8 2、T R P 5 3、G P R 1 3 7 C、Z F P 2 1 9、H D A C 1、E L M S A N 1 及び A C T R 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ；及び T 細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップを含む。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、方法は、T 細胞を含む試料を入手するステップ；T 細胞の D N A を変化させて、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ；及び T 細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップを含む。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、I N O 8 0 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質若しくは S W I / S N F ファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、I N O 8 0 ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、A c t r 5、I n o 8 0、I n o 8 0 c、I n o 8 0 b、A c t r 8、又はその組合せである。一部の実施形態では、S W I / S N F ファミリーメンバーは、c B A F 複合体のメンバーである。一部の実施形態では、S W I / S N F ファミリーメンバーは、A r i d 1 a、A r i d 2、A r i d 1 b、S m a r c b 1、S m a r c d 2、S m a r c a 4、S m a r c c 1、又はその組合せである。一部の実施形態では、方法は、T 細胞の D N A を変化させて、G A T A 3、W D R 8 2、T R P 5 3、G P R 1 3 7 C、Z F P 2 1 9、H D A C 1 及び E L M S A N 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップをさらに含む。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、D N A を変化させることは、T 細胞の疲弊を予防する又は減少させる。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、T 細胞は対象由来の生体試料に由来する。一部の実施形態では、T 細胞は腫瘍試料から単離される。一部の実施形態では、T 細胞はエキスピボで拡大増殖される。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、外来性受容体は T 細胞受容体 ( T C R ) 又はキメラ抗原受容体 ( C A R ) である。一部の実施形態では、外来性受容体は腫瘍抗原に特異的である。

【 0 0 1 7 】

10

20

30

40

50

対象において疾患又は障害を治療するための方法であって、本明細書に記載される操作されたT細胞又はその組成物の有効量を対象に投与することを含む方法がさらに提供される。一部の実施形態では、疾患又は障害は感染症又はがんを含む。一部の実施形態では、がんは腫瘍を含む。

#### 【0018】

一部の実施形態では、投与により、対象におけるがん細胞の数は減少する、対象における腫瘍量は減少する及び／若しくは除去される、並びに／又は非改変T細胞の投与と比べて増強されたがん治療が示される。

#### 【0019】

一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の治療薬を投与することをさらに含む。少なくとも1つの治療薬は、T細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択しうる。

#### 【0020】

一部の実施形態では、T細胞は対象にとって自己由来である。

#### 【0021】

一部の実施形態では、T細胞は、操作されていないT細胞が疲弊を表す条件下で機能性を維持する並びに／又は操作されていないT細胞と比べて改善された持続性及び機能を有する。

#### 【0022】

T細胞疲弊を予防する方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することを含む。

#### 【0023】

一部の実施形態では、方法は、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することを含む。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又はSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarb1、Smarb2、Smarb4、Smarb1c、又はその組合せである。一部の実施形態では、方法は、GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1及びELMSAN1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することをさらに含む。

#### 【0024】

一部の実施形態では、T細胞は、慢性抗原の存在下で増加した生存を有する。

#### 【0025】

操作されたT細胞は、外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含みうる。一部の実施形態では、外来性受容体はT細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)である。一部の実施形態では、外来性受容体は腫瘍抗原に特異的である。

#### 【0026】

方法は、T細胞の投与を必要とする対象にT細胞を投与することをさらに含みうる。一部の実施形態では、対象はがん又は感染性疾患を有する。

#### 【0027】

T細胞疲弊を促進する遺伝子を求めてスクリーニングする方法であって、慢性又は急性刺激の条件下で少なくとも6日間T細胞を培養するステップであって、T細胞のそれぞれが少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンを含む、ステップ；疲弊T細胞表面表現型を示していないT細胞を単離するステップ；及び少なくとも1つの遺伝子ノッ

10

20

30

40

50

クアウト又はロックダウンを同定するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【0028】

一部の実施形態では、T細胞はT細胞ライブラリーであり、T細胞ライブラリーはT細胞のゲノム中のそれぞれの遺伝子についてロックアウト又はロックダウンを有する少なくとも1つのT細胞を含む。一部の実施形態では、T細胞はCD8+T細胞である。一部の実施形態では、T細胞は対象から単離される。

【0029】

一部の実施形態では、T細胞は、それぞれの細胞が目的の遺伝子に向けられた少なくとも1つのガイドRNAを含むCRISPR-Casシステムを使用して作製される。

【0030】

一部の実施形態では、慢性刺激の条件は、抗CD3被覆プレートを使用してT細胞を培養することを含む。一部の実施形態では、慢性刺激の条件は、T細胞をIL-2を用いて培養することをさらに含む。一部の実施形態では、急性刺激の条件は、T細胞をIL-2を用いて培養することを含む。一部の実施形態では、培養は6~10日間続く。

【0031】

本明細書に記載される操作されたT細胞を含むシステム若しくはキット又は遺伝子操作T細胞用のシステムも本明細書で提供される。T細胞を遺伝子操作するためのシステムは、本明細書に記載されるクラスター化分散性短鎖反復回文配列(CRISPR)/CRISPR-関連タンパク質(Cas)システム、又はそれをコードする核酸(複数可)を含む。ある特定の実施形態では、T細胞を遺伝子操作するためのシステムは、Cas9(例えば、dCas9)、又はCas9をコードする核酸、及びT細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子に向けられたgRNA、又はgRNAをコードする核酸を含む。

【0032】

一部の実施形態では、T細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択されうる。

【0033】

一部の実施形態では、T細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子は、クロマチン再構成タンパク質をコードする遺伝子である。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質若しくはSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smardc1、Smardc2、Smardc4、Smardc1、又はその組合せである。

【0034】

一部の実施形態では、システム又はキットは、外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含む。

【0035】

一部の実施形態では、システム又はキットは、少なくとも1つの追加の治療薬をさらに含む。少なくとも1つの治療薬は、T細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択しうる。

【0036】

本開示の他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明に照らせば明白になる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A】図1A~1Fは、T細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的インビトロアッセイを示す。図1Aは、インビトロ疲弊アッセイの図である。

【図1B】図1A~1Fは、T細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的イン

10

20

30

40

50

ビトロアッセイを示す。図 1 B は、生細胞上でゲート開閉する、T 細胞疲弊アッセイの 0 日目と 10 日目の CD 8 + T 細胞の表面表現型を示す。

【図 1 C】図 1 A ~ 1 F は、T 細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的インビトロアッセイを示す。図 1 C は、慢性刺激の過程全体を通じての CD 8 + T 細胞の ATAC - seq プロファイルの主成分分析である。

【図 1 D】図 1 A ~ 1 F は、T 細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的インビトロアッセイを示す。図 1 D は、インビトロ疲弊アッセイでの各時点の代表的複製並びに腫瘍又は LCMV 中の T 細胞由来の以前公表された参照 ATAC - seq プロファイル (Miller ら、(2019) Nat. Immunol. 20、326 ~ 336 頁) についての Pdc d 1 及び Ent p d 1 遺伝子座である。

【図 1 E】図 1 A ~ 1 F は、T 細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的インビトロアッセイを示す。図 1 E は、インビトロ疲弊アッセイにおけるそれぞれの時点での「ターミナル疲弊ピークセット」でのそれぞれのピークの ATAC - seq カバレッジを示すヒートマップである。TIL からの参照データも含まれる。選択された最近接の遺伝子は右に示されている。

【図 1 F】図 1 A ~ 1 F は、T 細胞疲弊のエピジェネティック特徴を要約する例示的インビトロアッセイを示す。図 1 F は、それぞれの ATAC - seq 試料についての chromVAR モチーフ到達性ヒートマップである。選択されたモチーフは右に示されている。上位 100 の最も変化しやすいモチーフが示されている。

【図 2 A】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 A は、ゲノムワイドの T 細胞疲弊スクリーンの図である。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 2 B】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 B は、複製スクリーンと指示された色付きの遺伝子の選択された機能カテゴリーとの相関関係を示す。遺伝子セットは GO 用語に基づいており、手作業の注釈が補充されていた。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 2 C】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 C は、ボルケーノプロットであり、上位ヒットは標識されている。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 2 D】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 D は、異なる機能カテゴリー：インテグリン又は TCR シグナル伝達での上位ヒットについての個々の sgRNA 残差である。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 2 E】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 E は、上位 100 ヒットの GO 用語解析である。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 2 F】図 2 A ~ 2 F は、T 細胞疲弊のゲノムワイドでの機能的照合を示す。図 2 F は、異なる機能カテゴリー：クロマチン (左)、選択された受容体及び転写因子 (中央)、又は他 (右) での上位ヒットについての個々の sgRNA 残差である。すべてのガイド残差についてのヒストグラムが上に示されており、1000 のランダムに選択されたガイドが、目視基準に対してそれぞれの列のバックグラウンドに灰色で示されている。

【図 3】図 3 は、上位ヒットのサイトスケープネットワーク表示である。ゲノムワイドスクリーンからの上位陽性及び陰性ヒットが示されている。それぞれのタンパク質は、サイトスケープネットワーク中のノードにより表され、ゲノムワイドスクリーン中のその z -

10

20

30

40

50

スコアにより色付けされている。ノードは、高信頼度タンパク質 - タンパク質相互作用が存在する場合は接続される。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 A は、例示的インビボプールされたスクリーニングの図である。

【図 4 B】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 B は、MC - 38 腫瘍において濃縮された又は枯渇された遺伝子のボルケーノプロットである。

【図 4 C】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 C は、機能カテゴリーにより色付けされた脾臓 LFCz - スコアに対する腫瘍 LFCz - スコアの相関関係を示す。

10

【図 4 D】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 D は、ミニプール中の遺伝子についてのインビボ z - スコアとインビトロ（ゲノムワイド）z - スコアの相関関係を示す。

【図 4 E】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 E は、MC - 38 腫瘍において z - スコアにより色付けされるサイトスケープタンパク質 - タンパク質相互作用ネットワークである。

【図 4 F】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 F は、指示された遺伝子を標的にするそれぞれの sgRNA についての腫瘍対インプット log 倍率変化の箱ひげ図であり、平均対照 log 倍率変化が引かれている。

【図 4 G】図 4 A ~ 4 G は、インビボでの上位ヒットの標的化された経過観察を示す。図 4 G は、上位 15 インビボヒット並びに対照ガイド及び Cd3d に対するすべての腫瘍についての z - スコアである。

20

【図 5 A】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 A は、分別された TIL の直接捕獲 Perturb - seq の図である。

【図 5 B】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 B は、クラスター割り当てにより色付けされた TIL の scRNA - seq プロファイルである。

【図 5 C】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 C は、左が、それぞれの細胞において検出された攪乱により色付けされた細胞の scRNA - seq プロファイルである。細胞当たりでガイド、又は複数のガイドが検出されなかった細胞は灰色で示されている。5 C では、右はインビトロ及びインビボでのそれぞれの遺伝子ノックアウトの z - スコア（MC - 38 腫瘍 z - スコア）である。

30

【図 5 D】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 D は、対照細胞と比べた、細胞のゲノムワイドの遺伝子発現差とそれぞれの攪乱の相関関係である。遺伝子発現プロファイルは細胞全域で平均化され次に減算された。

【図 5 E】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 E は、異なる攪乱のために誘導された遺伝子のアップセットプロットである。

【図 5 F】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 F は、異なる攪乱のために抑制された遺伝子のアップセットプロットである。

【図 5 G】図 5 A ~ 5 G は、腫瘍浸潤リンパ球のインビボ Perturb - seq を示す。図 5 G は、カテゴリーによりグループ化され、選択された遺伝子及び異なる攪乱において対照と比べた発現の変化を示す。

40

【図 6 A】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 A は、インビトロ疲弊アッセイ全体にわたって慢性刺激される T 細胞の表面表現型を示す。

【図 6 B】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 B は、インビトロで慢性刺激された及び急性刺激された T 細胞の増殖のグラフである。

【図 6 C】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 C は、急性（左）及び慢性（右）刺激された T 細胞のエフェクターサイトカイン産生を示す。細胞は、最初の刺激の 8 日後 PMA 及びイオノマイシンで再刺激された。

【図 6 D】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 D は、急

50

性又は慢性刺激された O T - 1 T 細胞との共培養後の B 1 6 細胞の生存のグラフである。腫瘍細胞は同族ペプチド ( S I I N F E K L - S E Q 配列番号 1 ) を用いてパルスされた。

【図 6 E】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 E は、急性又は慢性刺激された T 細胞の養子移植後のインビボでの B 1 6 - 卵白アルブミン腫瘍増殖のグラフである。

【図 6 F】図 6 A ~ 6 F は、インビトロアッセイの追加の特徴付けを示す。図 6 F は、インビトロ疲弊アッセイにおけるそれぞれの時点での「ターミナル疲弊ピークセット」でのそれぞれのピークの A T A C - s e q カバレッジを示すヒートマップである。L C M V 中の T 細胞由来の参照データも含まれる。

【図 7 A】図 7 A ~ 7 D は、インビトロゲノムワイドスクリーンに対する品質管理データを示す。図 7 A は、スクリーンの 2 日目の B F P の発現を示す。

【図 7 B】図 7 A ~ 7 D は、インビトロゲノムワイドスクリーンに対する品質管理データを示す。図 7 B は、g D N A 抽出前の細胞の表面表現型を示す。

【図 7 C】図 7 A ~ 7 D は、インビトロゲノムワイドスクリーンに対する品質管理データを示す。図 7 C は、それぞれの試料の s g R N A 表示を示す。

【図 7 D】図 7 A ~ 7 D は、インビトロゲノムワイドスクリーンに対する品質管理データを示す。図 7 D は、それぞれの複製についてのガイド数相関関係（急性対慢性）のグラフである。C D 3 サブユニットは赤色で、他のガイドはすべて黒色で示されている。

【図 8 A】図 8 A ~ 8 D は、上位ヒットの L C M V クローン 1 3 発現解析を示す。図 8 A は、s c R N A - s e q データにおいて同定された細胞型のグラフである。

【図 8 B】図 8 A ~ 8 D は、上位ヒットの L C M V クローン 1 3 発現解析を示す。図 8 B は、単一細胞中の P d c d 1、H a v c r 2、T c f 7 及び C x 3 c r 1 の発現を示す。

【図 8 C】図 8 A ~ 8 D は、上位ヒットの L C M V クローン 1 3 発現解析を示す。図 8 C は、クラスター全体にわたる上位 1 0 0 インビトロヒットを含む遺伝子モジュールの発現のバイオリンプロットである。

【図 8 D】図 8 A ~ 8 D は、上位ヒットの L C M V クローン 1 3 発現解析を示す。図 8 D は、すべての単一細胞全体にわたる平均発現により色付けされる上位ヒットのサイトスケープネットワークである。

【図 9 A】図 9 A ~ 9 D は、標的化インビボスクリーニングについての追加のデータを示す。図 9 A は、ミニプールスクリーンにおけるそれぞれの群についての腫瘍サイズ及び T 細胞注入タイムラインのグラフである。

【図 9 B】図 9 A ~ 9 D は、標的化インビボスクリーニングについての追加のデータを示す。図 9 B、上は指示された遺伝子を標的にするそれぞれの s g R N A について脾臓対インプット l o g 倍率変化の箱ひげ図であり、平均対照 l o g 倍率変化が減算されている。図 9 B、下は上位 1 5 インビボヒット並びに対照ガイド及び C d 3 d に対するすべての脾臓についての z - スコアのヒートマップである。

【図 9 C】図 9 A ~ 9 D は、標的化インビボスクリーニングについての追加のデータを示す。図 9 C は、腫瘍中の上位 2 0 陽性ヒットの G O 用語解析である。

【図 9 D】図 9 A ~ 9 D は、標的化インビボスクリーニングについての追加のデータを示す。図 9 D は、9 個の上位エピジェネティックヒットについての L C M V 発現解析である。

【図 1 0 A】図 1 0 A ~ 1 0 E は、インビボ直接捕獲 P e r t u r b - s e q についての追加のデータを示す。図 1 0 A は、クラスターによる P d c d 1、H a v c r 2 及び M k i 6 7 の発現を示すバイオリンプロットである。

【図 1 0 B】図 1 0 A ~ 1 0 E は、インビボ直接捕獲 P e r t u r b - s e q についての追加のデータを示す。図 1 0 B は、クラスター 1 ( C 1 ) とクラスター 2 ( C 2 ) を比較するボルケーノプロットである。選択された差次的遺伝子が示されている。

【図 1 0 C】図 1 0 A ~ 1 0 E は、インビボ直接捕獲 P e r t u r b - s e q についての追加のデータを示す。図 1 0 C は、選択された転写因子 T b x 2 1、T o x、E o m e s

10

20

30

40

50

及び T c f 7 の発現を示す。

【図 1 0 D】図 1 0 A ~ 1 0 E は、インビボ直接捕獲 P e r t u r b - s e q についての追加のデータを示す。図 1 0 D は、それぞれの遺伝子ノックアウトを含む細胞の視覚化である。図 1 0 E、上は、それぞれの攪乱のために抑制された又は誘導された遺伝子の数のグラフである。

【図 1 0 E】図 1 0 A ~ 1 0 E は、インビボ直接捕獲 P e r t u r b - s e q についての追加のデータを示す。図 1 0 E、下は、それぞれの攪乱のために N r 4 a 3 - K O と共有される抑制された又は誘導された遺伝子の数のグラフである。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、慢性対急性刺激スクリーン比較の c a s T L E ボルケーノプロットであり、上位のヒットは標識されている。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、ミニプール対ゲノムワイドスクリーンでの急性対慢性 z - スコアの相関関係を示す。

【図 1 1 C】図 1 1 C は、急性対インプット（左）又は慢性対インプット（右）に対するミニプール慢性対急性 z - スコアの相関関係を示す。（ G ）及び（ H ）での遺伝子は機能カテゴリー： T C R シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達（橙色）、クロマチン（青色）又は他（灰色）により色付けされている。（ H、左）での色付けされた箱は、急性刺激後に増強された、類似する、又は減少した拡大増殖（上から下に）を意味する。

【図 1 2 A】図 1 2 A は、機能カテゴリーにより色付けされた、腫瘍 L E C z - スコアと脾臓 L F C z - スコアの相関関係を示す。

【図 1 2 B】図 1 2 B は、 C R I S P R ミニプール中の遺伝子についてのインビボ z - スコアとインビトロ z - スコアの相関関係を示す。

【図 1 2 C】図 1 2 C は、 C R I S P R ミニプール中の遺伝子についてのインビボ M C - 3 8 と B 1 6 腫瘍 z - スコアの相関関係を示す。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、 M C - 3 8 腫瘍において z - スコアにより色付けされたサイトスケープタンパク質 - タンパク質相互作用ネットワークである。

【図 1 2 E】図 1 2 E、上は、指示された遺伝子を標的にするそれぞれの s g R N A についての腫瘍対インプット l o g 倍率変化の箱ひげ図であり、平均対照 l o g 倍率変化が減算されている。図 1 2 E、下は、同じヒットについての指示されたインビボ又はインビトロスクリーンの s g R N A 平均を示すヒートマップである。

【図 1 2 F】図 1 2 F は、腫瘍対インプット比較（左）、脾臓対インプット（中央）、及びインビトロ慢性対急性（右）を示す 6 個の上位ヒットについての個々の s g R N A 残差である。

【図 1 3 A】図 1 3 A ~ 1 3 F は、 c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 A は、 A r i d 1 a - s g R N A 対 C T R L 1 T 細胞のインビトロ競合アッセイを示す。左：細胞は 4 日目に指示された比で混合され、慢性刺激アッセイにおいて 6 日間継代培養された。10 日目、 C T R L 1 T 細胞と比べた増殖及び表面表現型がフローサイトメトリーにより評価された。

【図 1 3 B】図 1 3 A ~ 1 3 F は、 c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 B は、 A r i d 1 a - s g R N A 対 C T R L 1 T 細胞のインビボ競合アッセイを示す。細胞は 6 日目に混合され（インプット）、次に担腫瘍マウス中に移植された。15 日目、腫瘍の相対的増殖がフローサイトメトリーにより評価された。

【図 1 3 C】図 1 3 A ~ 1 3 F は、 c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 C は、それぞれのコホートについての腫瘍サイズのグラフである。統計的有意性は 15 日目に評価された。

【図 1 3 D】図 1 3 A ~ 1 3 F は、 c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 D は、 A r i d 1 a - s g R N A T 細胞が担腫瘍マウスの生存を有意に改善することを

10

20

30

40

50

示す生存グラフである。

【図 1 3 E】図 1 3 A ~ 1 3 F は、c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 E は、M C - 3 8 対 B 1 6 腫瘍モデルでの S W I / S N F C R I S P R ミニプール腫瘍濃縮の相関関係を示す。

【図 1 3 F】図 1 3 A ~ 1 3 F は、c B A F 活性を調整すれば抗腫瘍免疫を増強できることを示す S W I / S N F ミニプール C R I S P R スクリーン及び機能研究を示す。図 1 3 F は、M C - 3 8 腫瘍における S W I / S N F C R I S P R ミニプール実験からの z - スコアにより色付けされた 3 つの B A F 複合体の絵画である。B A F 複合体絵画は ( M a s h t a l i r ら、2 0 1 8 年 ) から改作された。\*  $p < 0.05$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。

10

【図 1 4 A】図 1 4 A ~ 1 4 D は、インビトロ及びインビボでのヒト T 細胞における A R I D 1 A の保存された機能を示す。図 1 4 A は、指示された R N P の電気穿孔後の一次ヒト T 細胞の増殖及び生存能力のグラフである。左：急性刺激された T 細胞。右：抗 C D 3 被覆プレートを使用する慢性刺激された T 細胞。示されるデータは、3 つの独立した実験及び 3 つのドナーを表している。

【図 1 4 B】図 1 4 A ~ 1 4 D は、インビトロ及びインビボでのヒト T 細胞における A R I D 1 A の保存された機能を示す。図 1 4 B は、N Y - E S O - 1 特異的 T C R、1 G 4 を形質導入された一次ヒト C D 8 + T 細胞での C R I S P R ミニプールスクリーンの模式図である。

20

【図 1 4 C】図 1 4 A ~ 1 4 D は、インビトロ及びインビボでのヒト T 細胞における A R I D 1 A の保存された機能を示す。図 1 4 C は、遺伝子により凝集されたヒト C R I S P R ミニプールスクリーンの結果を示す。図 1 4 D は、個々の s g R N A 複製が点として示されるヒト C R I S P R ミニプールスクリーンの結果を示す。遺伝子は最高から最低平均 L F C へと順序付けされている。(図 1 4 C 及び 1 4 D) に示される結果は、2 つの独立したドナー、ドナー当たり 2 マウス、及び標的遺伝子当たり 2 s g R N A から組み合わせられ、標的遺伝子あたり全部で  $n = 8$  s g R N A 複製。(図 1 4 C 及び 1 4 D) では、橙色は抑制受容体を示し、赤色は T C R シグナル伝達経路遺伝子を示し、青色はクロマチンリモデラーを示し、灰色は負の対照を示す。

【図 1 4 D】図 1 4 A ~ 1 4 D は、インビトロ及びインビボでのヒト T 細胞における A R I D 1 A の保存された機能を示す。図 1 4 C は、遺伝子により凝集されたヒト C R I S P R ミニプールスクリーンの結果を示す。図 1 4 D は、個々の s g R N A 複製が点として示されるヒト C R I S P R ミニプールスクリーンの結果を示す。遺伝子は最高から最低平均 L F C へと順序付けされている。(図 1 4 C 及び 1 4 D) に示される結果は、2 つの独立したドナー、ドナー当たり 2 マウス、及び標的遺伝子当たり 2 s g R N A から組み合わせられ、標的遺伝子あたり全部で  $n = 8$  s g R N A 複製。(図 1 4 C 及び 1 4 D) では、橙色は抑制受容体を示し、赤色は T C R シグナル伝達経路遺伝子を示し、青色はクロマチンリモデラーを示し、灰色は負の対照を示す。

30

【図 1 5 A】図 1 5 A ~ 1 5 G は、T I L での c B A F と I N O 8 0 複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボ P e r t u r b - s e q を示す。図 1 5 A は、選別された T I L の直接捕獲 P e r t u r b - s e q の模式図である。

40

【図 1 5 B】図 1 5 A ~ 1 5 G は、T I L での c B A F と I N O 8 0 複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボ P e r t u r b - s e q を示す。図 1 5 B は、クラスター割り当てにより色付けされた T I L の s c R N A - s e q プロファイルである。

【図 1 5 C】図 1 5 A ~ 1 5 G は、T I L での c B A F と I N O 8 0 複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボ P e r t u r b - s e q を示す。図 1 5 C は、それぞれの細胞で検出された攪乱により色付けされた細胞の s c R N A - s e q プロファイルである。ガイド、又は複数のガイドが検出されなかった細胞は灰色で示されている。

【図 1 5 D】図 1 5 A ~ 1 5 G は、T I L での c B A F と I N O 8 0 複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボ P e r t u r b - s e q を示す。図 1 5 D は、それ

50

それぞれの単一細胞での選択されたマーカー遺伝子の発現を示す。

【図15E】図15A～15Gは、TILでのcBAFとINO80複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボPerturb-seqを示す。図15Eは、それぞれのクラスターについてのLCMVシグネチャー遺伝子セットの分析である。遺伝子セット濃縮スコアは、それぞれの単一細胞について計算され、細胞値はクラスターにより平均され、z - スコアをつけた。

【図15F】図15A～15Gは、TILでのcBAFとINO80複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボPerturb-seqを示す。図15Fは、sgRNAの対の遺伝子発現差のピアソン相関関係のヒストグラムである。上：同一遺伝子を標的にするペアは青色で示され、他のペアは灰色で示されている。下：同一タンパク質複合体を標的にするペアは赤色で示され、他のペアは灰色で示されている。解析において検討される複合体は、cBAF (Arid1a、Arid1b、Smardc2及びSmardc1) 及びINO80 (Ino80c及びActr5) である。同一遺伝子を標的にするsgRNAのペアは排除される。

10

【図15G】図15A～15Gは、TILでのcBAFとINO80複合体のはっきり異なる転写役割を明らかにするインビボPerturb-seqを示す。図15G、左：sgRNAのそれぞれのペアの遺伝子発現差の相関関係のヒートマップ。図15G、中央（左から右へ）：移植前試料でのそれぞれのsgRNAの表示、Perturb-seqデータセットでのそれぞれのsgRNAの細胞カウント、及び対照と比べたそれぞれのsgRNAの見積もられた倍率変化。図15G、右：それぞれのsgRNAについてのそれぞれのクラスターにおける細胞の割合。

20

【図16A】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Aは、指示された攪乱を有する凝集細胞対CTL細胞を比較するボルケーノプロットである。

【図16B】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Bは、それぞれの攪乱により誘導される遺伝子発現差のペアワイズ相関関係である。

【図16C-1】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Cは、少なくとも1つの攪乱におけるすべての上方調節（上）又は下方調節（下）遺伝子のヒートマップであり、どの攪乱が発現に対して最も強力な効果をもたらすかによりグループ化されている。それぞれのブロックでの選択された遺伝子は標識されている。

30

【図16C-2】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Cは、少なくとも1つの攪乱におけるすべての上方調節（上）又は下方調節（下）遺伝子のヒートマップであり、どの攪乱が発現に対して最も強力な効果をもたらすかによりグループ化されている。それぞれのブロックでの選択された遺伝子は標識されている。

【図16D】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Dは、cBAFサブユニット、Arid1a、Smardc2及びSmardc1の攪乱により上方調節された又は下方調節された遺伝子セットの比較を示す。

40

【図16E】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Eは、INO80サブユニット、Actr5、又はIno80cの攪乱により上方調節された又は下方調節された遺伝子セットの比較を示す。

【図16F】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図16Fは、cBAFサブユニット、INO80サブユニット、又はPdcd1、Gata3、若しくはArid2の攪乱により上方調節された遺伝子セットの比較を示す。

【図16G】図16A～16Hは、cBAF枯渇T細胞が増強されたエフェクター遺伝子

50

シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図 16 G は、LCMV 発現データ (Danielら、2021 年)における上方調節及び下方調節遺伝子セットの濃縮である。それぞれの遺伝子セットのモジュールスコアは、LCMV データセットにおいてそれぞれの単一細胞について計算され、クラスターにより平均され、その後 z - スコアをつけて指示された濃縮 z - スコアを得た。

【図 16 H】図 16 A ~ 16 H は、c B A F 枯渇 T 細胞が増強されたエフェクター遺伝子シグネチャー及び減少したターミナル疲弊を示すこと示している。図 16 H は、指示された遺伝子セットの選択された GO 用語を示す。

【図 17 A】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 17 A は、インビトロ疲弊競合アッセイにおける A r i d 1 a - s g R N A 及び C T R L 1 細胞の A T A C - s e q プロファイルの主成分解析を示す。非攪乱ナীব及び活性化試料 (0 日目及び 2 日目) は参照のために含まれる。

【図 17 B】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 17 B は、それぞれの遺伝子型について 6 日目から 10 日目の「開放」及び「閉鎖」A T A C - s e q ピークセットの比較を示す。

【図 17 C】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 16 C は、「開放」及び「閉鎖」A T A C - s e q ピークセットの視覚化であり、選択された最近接の遺伝子は標識されている。

【図 17 D】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 16 D は、選択された遺伝子座の A T A C - s e q シグナルトラックを示す。それぞれの条件に付いて代表的な複製が示されている。

【図 17 E】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 16 E は、インビトロ疲弊アッセイにおける 6 日目及び 10 日目の A r i d 1 a - s g R N A 及び C T R L 1 細胞についての「ターミナル疲弊ピークセット」でのそれぞれのピークの A T A C - s e q カバー度を示すヒートマップである。T I L 由来の参照データ、並びに参照ナীব及び活性化細胞プロファイルも含まれる。

【図 17 F】図 17 A ~ 17 F は、A r i d 1 a が疲弊した T 細胞クロマチン状態の獲得を促進することを示す。図 16 F は、A r i d 1 a - s g R N A 及び C T R L 1 A T A C - s e q 試料についての c h r o m V A R モチーフ到達性ヒートマップである。選択されたモチーフは、右に示されている。上位 100 の変化しやすいモチーフが示されている。

【図 18 A】図 18 A は、6 日間の慢性刺激後 (単離後 8 日目) の急性 (左) 及び慢性 (右) 刺激された T 細胞のエフェクターサイトカイン産生を示す。細胞は最初の刺激の 8 日後 P M A 及びイオノマイシンで再刺激された。

【図 18 B】図 18 B は、インビトロにおいて指示された時点で T e r m . T E X ピークセット (上) 及び P r o g . T E X ピークセット (下) でのピークに対するピーク到達性の経験的累積分布のグラフである。T I L からの参照プロファイルは指示通りに含まれる。

【図 18 C】図 18 C は、インビトロ疲弊アッセイにおける指示されたピークセット及び参照 T I L 試料についての箱ひげ図である。それぞれの点は 1 つのピークを表す。

【図 19 A】図 19 A 及び 19 B は、急性刺激、慢性刺激 (6 日間の抗 C D 3 刺激) (図 19 A) 又は修正慢性刺激プロトコル (48 時間休止後の 6 日間の抗 C D 3 刺激) (図 19 B) 後のサイトカイン産生の比較である。

【図 19 B】図 19 A 及び 19 B は、急性刺激、慢性刺激 (6 日間の抗 C D 3 刺激) (図 19 A) 又は修正慢性刺激プロトコル (48 時間休止後の 6 日間の抗 C D 3 刺激) (図 19 B) 後のサイトカイン産生の比較である。

【図 19 C】図 19 C は、ゲノムワイドスクリーンでのそれぞれの試料について示されるジニ指数及び経験的累積分布関数である。

【図 20 A - 1】図 20 A ~ 20 E は、C R I S P R 解析戦略の比較を示す。図 20 A は、c a s T L E (上左)、M A G e C K (上右)、及び閉鎖パイプライン (下) を使用する

10

20

30

40

50

るゲノムワイドC R I S P Rスクリーン結果のボルケーノプロットである。

【図20A-2】図20A~20Eは、C R I S P R解析戦略の比較を示す。図20Aは、c a s T L E（上左）、M A G e C K（上右）、及び閉鎖パイプライン（下）を使用するゲノムワイドC R I S P Rスクリーン結果のボルケーノプロットである。

【図20B】図20A~20Eは、C R I S P R解析戦略の比較を示す。図20Bは、3つのパイプラインのそれぞれについてのヒットリストの比較を示す。

【図20C】図20A~20Eは、C R I S P R解析戦略の比較を示す。図20Cは、閉鎖パイプラインにより計算されたL F C差対c a s T L E効果（左）及びM A G e C K L F C（右）の比較を示す。

【図20D】図20A~20Eは、C R I S P R解析戦略の比較を示す。図20Dは、R p l 1 3 aについてのカウント表である。 10

【図20E】図20A~20Eは、C R I S P R解析戦略の比較を示す。図20Eは、z - スコアがすべてのs g R N A又は臭覚受容体のセット（V m n r \* 遺伝子）と比べて計算される場合のゲノムワイドスクリーン結果を示す。

【図21A】図21A~21Eは、標的にされたインビトロスクリーニングについてのデータを示す。図21Aは、インビトロミニプールスクリーンでのそれぞれの試料のs g R N A表示である。

【図21B】図21A~21Eは、標的にされたインビトロスクリーニングについてのデータを示す。図21Bは、ミニプールスクリーンでのそれぞれの試料のs g R N Aカウントの相関関係を示す。 20

【図21C】図21A~21Eは、標的にされたインビトロスクリーニングについてのデータを示す。図21Cは、慢性対急性複製z - スコアの相関関係を示す。

【図21D】図21A~21Eは、標的にされたインビトロスクリーニングについてのデータを示す。図21Dは、慢性対急性ミニプールスクリーンにおいて遺伝子とそのz - スコアにより色付けされているサイトスケープ相互作用ネットワークである。

【図21E】図21A~21Eは、標的にされたインビトロスクリーニングについてのデータを示す。図21Eは、急性刺激において遺伝子とそのフィットネスカテゴリー分類により色付けされているサイトスケープ相互作用ネットワークである。

【図22A-1】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Aは、インビボミニプールスクリーンにおけるそれぞれの試料についてのs g R N Aプールカバレッジを示す。 30

【図22A-2】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Aは、インビボミニプールスクリーンにおけるそれぞれの試料についてのs g R N Aプールカバレッジを示す。

【図22B】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Bは、「T C Rシグナル伝達」及び「インテグリンシグナル伝達」カテゴリーにおける選択された遺伝子についての腫瘍、脾臓及びインビトロミニプール慢性対急性でのs g R N A残差である 40

【図22C】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Cは、指示された遺伝子を標的にするそれぞれのs g R N Aについての脾臓対インプット及び急性対慢性ログ倍率変化の箱ひげ図であり、平均対照ログ倍率変化が減算されている。

【図22D】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Dは、A r i d 1 a s g R N Aの編集効率のサンガーシーケンシング（T I D E）である。

【図22E】図22A~22Fは、A r i d 1 aターゲティングs g R N Aの標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図22Eは、A r i 50

d 1 a s g R N A s、並びに A r i d 1 b 及び S m a r c a 4 発現についてのタンパク質ノックダウンのウェスタンブロット解析である。

【図 2 2 F】図 2 2 A ~ 2 2 F は、A r i d 1 a ターゲティング s g R N A の標的にされたインビボスクリーニング及び妥当性確認についてのデータを示す。図 2 2 F は、A r i d 1 a のそれぞれの同定されたアイソフォーム（パネル C 3 バンド）についてのタンパク質ノックダウンの定量化を示す。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 、 $**** p < 0.0001$ 。

【図 2 3 A】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 A は、それぞれの独立した実験により色付けされた T I L の s c R N A - s e q プロファイルである。

【図 2 3 B】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 B は、それぞれの試料により色付けされた T I L の s c R N A - s e q プロファイルである。

【図 2 3 C】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 C は、細胞周期の予想される段階により色付けされた T I L の s c R N A - s e q プロファイルである。

【図 2 3 D】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 D は、それぞれのクラスターについて示される追加のマーカ遺伝子を示す。

【図 2 3 E】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 E は、単一細胞プロファイルが L C M V クラスターにより色付けされた拡大参照 L C M V データセットを示す。

【図 2 3 F】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 F は、単一細胞プロファイルが L C M V 感染（急性はアームストロング感染に相当し、慢性はクローン 13 に相当する）及び時点（感染後 8 日又は 21 日）により色付けされている拡大 L C M V データセットを示す。

【図 2 3 G】図 2 3 A ~ 2 3 G は、インビボ P e r t u r b - s e q に関するデータを示す。図 2 3 G は、それぞれのクラスター上にサブセットされた遺伝子発現差の相関関係のヒートマップである。指示された遺伝子ノックダウンはそれぞれのクラスター内で C T R L 1 細胞と比較された。比較群中 < 150 細胞の比較は、検出力の欠如のせいで除外される。

【図 2 4 A】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 A は、c B A F サブユニット、I N O 8 0 サブユニット、又は P d c d 1 - s g R N A、G a t a 3 - s g R N A、若しくは A r i d 2 - s g R N A の攪乱により下方調節された遺伝子セットの比較を示す。

【図 2 4 B - 1】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 B は、拡大 L C M V 参照データセットにおいてそれぞれの細胞について計算された指示された遺伝子セットのモジュールスコアである。

【図 2 4 B - 2】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 B は、拡大 L C M V 参照データセットにおいてそれぞれの細胞について計算された指示された遺伝子セットのモジュールスコアである。

【図 2 4 C】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 C は、インビトロ疲弊アッセイ及び参照 T I L 試料での指示されたピークセットについての箱ひげ図である。それぞれの点は 1 つのピークを表す。

【図 2 4 D】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 D は、インビトロでの指示された試料についての T e r m . T E X ピークセット（上）及び P r o g . T E X ピークセット（下）でのピークに対するピーク到達性の経験的累積分布のグラフである。T I L からの参照プロフ

10

20

30

40

50

ファイルは指示された通りに含まれる。

【図 2 4 E】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 E は、6 日の間慢性刺激された一次ヒト T 細胞の A T A C - s e q データの主成分解析である。(図 2 4 E ~ 2 4 G) での結果は、ドナーあたり 2 つの異なる A R I D 1 A ターゲティング s g R N A を用いた 2 つの独立した実験での 3 つの異なるヒトドナーから合併される。

【図 2 4 F】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 F は、A R I D 1 A - s g R N A と A A V S 一次ヒト T 細胞の間の差示的ピークを示す。(図 2 4 E ~ 2 4 G) での結果は、ドナーあたり 2 つの異なる A R I D 1 A ターゲティング s g R N A を用いた 2 つの独立した実験での 3 つの異なるヒトドナーから合併される。

10

【図 2 4 G】図 2 4 A ~ 2 4 G は、上方調節及び下方調節遺伝子セットに関するデータ並びに A T A C - s e q データを示す。図 2 4 G は、A A V S 「アップ」ピークにおいて濃縮された T F モチーフの H O M E R 解析である。選択された高ランクのモチーフが示されている。(図 2 4 E ~ 2 4 G) での結果は、ドナーあたり 2 つの異なる A R I D 1 A ターゲティング s g R N A を用いた 2 つの独立した実験での 3 つの異なるヒトドナーから合併される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 8】

本明細書では、インビトロ T 細胞疲弊モデルが、T 細胞機能に影響を及ぼす遺伝子を求めるゲノムワイドスクリーニングを可能にした。このモデル及びゲノムワイド C R I S P R スクリーンを使用して、いくつかの遺伝子標的が同定され、その遺伝子が欠失すると、C A R - T 細胞疲弊が予防され、インビトロで慢性抗原の存在下で T 細胞生存が改善され、インビボでの腫瘍モデルにおいて T 細胞持続性及び機能が改善された。これらは、A R I D 1 A 、W D R 8 2 、I N O 8 0 、H D A C 1 及び Z F P 2 1 9 を含む、遺伝子調節及びエピジェネティック修飾に関与するいくつかの遺伝子を含んでいた。これらの遺伝子のそれぞれを欠失させる細胞療法は、改善された C A R - T 又は他の養子 T 細胞ベースの療法に用途がある。

20

【0 0 3 9】

本セクション及び本明細書の全開示で使用されるセクション見出しは、体系化のみを目的とし限定的であることを意図していない。

30

【0 0 4 0】

1. 定義

用語「含む ( c o m p r i s e ( s ) )」、「含む ( i n c l u d e ( s ) )」、「有する ( h a v i n g )」、「有する ( h a s )」、「できる ( c a n )」、「含有する ( c o n t a i n ( s ) )」及びその異形は、本明細書で使用される場合、追加の行為又は構造物の可能性を排除しない開放型転換語、用語、又は単語であることが意図されている。単数形「1 つの ( a )」、「1 つの ( a n d )」及び「その ( t h e )」は、文脈が別の方法ではっきりと指示しなければ、複数の参照を含む。本開示は、明示的に述べられているか又はそうでないかにかかわらず、本明細書に提示される実施形態又は要素「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」他の実施形態も想定している。

40

【0 0 4 1】

本明細書での数値範囲の列挙では、同じ精度を有するその間のそれぞれ介在する数をはっきりと想定されている。例えば、6 ~ 9 の範囲では、6 と 9 に加えて数の 7 と 8 が想定されており、範囲 6 . 0 ~ 7 . 0 では、数 6 . 0 、6 . 1 、6 . 2 、6 . 3 、6 . 4 、6 . 5 、6 . 6 、6 . 7 、6 . 8 、6 . 9 、及び 7 . 0 がはっきりと想定されている。

【0 0 4 2】

本明細書で別段定義されなければ、本開示に関連して使用される科学用語及び専門用語は、当業者が一般的に理解している意味を有するものとする。用語の意味と範囲は明白であるべきであるが、いかなる潜在的な意味不明の場合でも、本明細書に提供される定義が

50

いかなる辞書の又は外部の定義よりも優先する。さらに、文脈により別段要求されなければ、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【 0 0 4 3 】

用語「操作された」、「天然には存在しない」、「修飾された」、及び「合成の」は互換的に使用され、人の手の関与を示す。これらの用語は、細胞又は核酸に言及する場合は、核酸又は細胞が、自然の中で天然に会合しており自然の中で見出される少なくとも1つの他の成分が少なくとも実質的にないことを意味する。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、「核酸」又は「核酸配列」とは、ピリミジン及び/又はプリン塩基、好ましくは、それぞれシトシン、チミン、及びウラシル並びにアデニン及びグアニンのポリマー又はオリゴマーのことである (Albert L. Lehninger、Principles of Biochemistry、at 793~800頁 (Worth Pub. 1982年) 参照)。本技術は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はペプチド核酸成分、及びこれらの塩基のメチル化、ヒドロキシメチル化、又はグリコシル化型などのその任意の化学的変異体及び同類のものを想定している。ポリマー又はオリゴマーは、組成が異種又は同種でもよく、天然に存在する源から単離されても人工的に又は合成的に作製されてもよい。さらに、核酸はDNA若しくはRNA、又はその混合物でもよく、一本鎖又はホモ二重鎖、ヘテロ二重鎖、及びハイブリッド状態を含む二本鎖形態で持続的に又は過渡的に存在してもよい。用語「核酸」又は「核酸配列」は、非天然ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及び/又は天然のヌクレオチドと同じ機能を示すことができる非ヌクレオチド構成要素 (例えば、「ヌクレオチド類似物」) を含む鎖も包含しうる; さらに、本明細書で使用される用語「核酸配列」とは、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド、及びその断片又は部分、並びにゲノム又は合成起源のDNA又はRNAのことであり、これらは一本鎖でも二本鎖でもよく、センス鎖又はアンチセンス鎖を表してもよい。用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」及び「オリゴヌクレオチド」は互換的に使用される。これらの用語は、任意の長さのポリマー型のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はその類似物のことである。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される場合、用語「提供する」、「投与する」、及び「導入する」は本明細書では互換的に使用され、所望の部位への組成物の少なくとも部分的局在化をもたらす方法又は経路により本開示の組成物を対象中に配置することを指す。組成物は、対象中の所望の位置へ送達する任意の適切な経路により投与することができる。

【 0 0 4 6 】

「対象」又は「患者」はヒトでも非ヒトでもよく、例えば、研究目的での「モデル系」として使用される、本明細書に記載されるようなマウスモデルである、動物系統又は種を含んでよい。同様に、対象は成人又は青少年 (例えば、子供) を含んでよい。さらに、対象は、任意の生きた生物、好ましくは、本明細書で想定される組成物の投与から利益を受けうる哺乳動物 (例えば、ヒト及び非ヒト) を意味してもよい。哺乳動物の例は、哺乳綱: ヒト、チンパンジー及び他の類人猿などの非ヒト霊長類並びにサル種; ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの農場動物; ウサギ、イヌ及びネコなどの飼育動物; ラット、マウス及びモルモットなどの齧歯類を含む実験動物の任意のメンバー、並びに同類のものを含むがこれらに限定されない。非哺乳動物の例は、トリ、サカナ及び同類のものを含むがこれらに限定されない。一実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、及び同類のものは、本明細書に記載される操作されたT細胞又は組成物が適切な対照対象に与えられた場合、疾患又は傷害の進行を遅くする、停止する、又は元に戻すことを意味する。この用語は、そのような疾患又は傷害の進行を、その症状を取り除く又は大幅に減少させる点まで逆転させることも意味する。したがって、「治療する」は、対象への本明細書に記載される操作

されたT細胞又は組成物の適用又は投与を意味し、対象は疾患又は疾患の症状を有し、目的は疾患又は疾患の症状を治癒する、治す、軽減する、緩和する、変更する、治療する、寛解させる、改善する、又は影響を及ぼすことである。

#### 【0048】

##### 2. 操作されたT細胞

T細胞持続性及び機能性を促進する又は支持する少なくとも1つの遺伝子を欠く操作されたT細胞が本明細書で提供される。その遺伝子は、クロマチン形成、クロマチン再構成（例えば、ATP依存性クロマチン再構成）、T細胞受容体シグナル伝達経路、免疫応答活性化シグナル伝達、免疫応答活性化細胞表面受容体シグナル伝達経路、ヌクレオソーム分解及び/又はFc受容体シグナル伝達経路において役割を果たしている可能性がある。一部の実施形態では、遺伝子は、クロマチン再構成及び転写因子を含む。

10

#### 【0049】

一部の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子が、図3、5C、及び9Bに含まれる遺伝子から選択される。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、INO80C（INO80複合体サブユニットC）、GATA3（GATA結合タンパク質3）、ARID1A（AT-リッチ相互作用ドメイン1A）、WDR82（WDリピートドメイン82）、TRP53（腫瘍タンパク質P53）、GPR137C（Gタンパク質共役型受容体137C）、ZFP219（亜鉛フィンガータンパク質219）、HDAC1（ヒストンデアセチラーゼ1）、ELMSAN1（ELM2及びMyb/SANT様ドメイン含有1）、又はACTR8（アクチン関連タンパク質8）である。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8のうちの2つ以上を欠く。一部の実施形態では、操作されたT細胞はNR4A3（核受容体サブファミリー4グループAメンバー3）をさらに欠く。

20

#### 【0050】

一部の実施形態では、操作されたT細胞は、少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠く。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、2つ又はそれよりも多いクロマチン再構成タンパク質又はそれをコードする遺伝子を欠く。一部の実施形態では、少なくとも1つのクロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又はSWI/SNF（SWITCH/スクロース非発酵性）ファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5（アクチン関連タンパク質5）、Ino80（INO80複合体ATPアーゼサブユニット）、Ino80c（INO80複合体サブユニットC）、Ino80b（INO80複合体サブユニットB）、Actr8（アクチン関連タンパク質8）、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーはcBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arld1a（AT-リッチ相互作用ドメイン1A）、Arld2（AT-リッチ相互作用ドメイン2）、Arld1b（AT-リッチ相互作用ドメイン1B）、Smardc1（SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存性レギュレータ、サブファミリーb、メンバー1）、Smardc2（SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存性レギュレータ、サブファミリーd、メンバー2）、Smardc4（SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存性レギュレータ、サブファミリーa、メンバー4）、Smardc1（SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存性レギュレータ、サブファミリーc、メンバー1）、又はその組合せである。一部の実施形態では、操作されたT細胞は、GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、及びELMSAN1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をさらに欠く。

30

40

#### 【0051】

「遺伝子を欠く」とは、機能的な遺伝子産物が発現されない又は発現すると直ちに分解

50

の標的にされることになる完全な又は部分的な欠失、突然変異、又は他の破壊を指すことができる。したがって、遺伝子を欠くことは、遺伝子の一部が変更され、それによって転写及び／又は翻訳に影響を及ぼす、例えば、ノックアウト技法を通じて又は所望のタンパク質について追加の遺伝子の挿入若しくは既存の配列の転写を調節する制御配列の挿入により遺伝子を読み取り不可能にするような遺伝コードに対する任意の破壊から生じうる。ある特定の実施形態では、遺伝子又はその一部が欠失され、一般的には遺伝子ノックアウトと呼ばれる。

#### 【 0 0 5 2 】

クラスター化分散性短鎖反復回文配列 ( C R I S P R ) / C R I S P R - 関連タンパク質 ( C a s ) システム、メガヌクレアーゼ、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 ) 又は亜鉛フィンガーヌクレアーゼ ( Z F N ) の使用を含むがこれらに限定されない、遺伝子操作のために当技術分野で公知であるいかなる方法でも、本明細書に記載される操作された T 細胞を作製するのに使用しうる。

#### 【 0 0 5 3 】

一部の実施形態では、T 細胞は、T 細胞持続性及び機能性を促進する又は支持する少なくとも 1 つの遺伝子が欠けていない T 細胞である、非改変 T 細胞が疲弊を示す条件下で機能性を維持する (例えば、過剰な抗原に曝露された T 細胞の機能性を維持する)。「T 細胞疲弊」とは、T 細胞機能の喪失のことであり、これは感染 (例えば、慢性感染) 又は疾患の結果として起こりうる。T 細胞疲弊は、疲弊マーカー及び抑制性受容体 (例えば、P D - 1、T I M - 3 及び L A G - 3 ) の発現の増加、アポトーシス、並びにサイトカイン分泌の減少に関連している。

#### 【 0 0 5 4 】

本発明は、T 細胞持続性及び機能性を促進する又は支持する少なくとも 1 つの遺伝子を欠くように操作されている T 細胞のタイプにより制限されない。T 細胞は、C D 3 + T 細胞 (例えば、C D 4 + と C D 8 + T 細胞の組合せ)、C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、ナチュラルキラー ( N K ) T 細胞、アルファベータ T 細胞、ガンマデルタ T 細胞、又はその任意の組合せから選択しうる。一部の実施形態では、T 細胞はメモリー T 細胞 (例えば、セントラルメモリー T 細胞又はエフェクターメモリー T 細胞) である。一部の実施形態では、T 細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球である。一部の実施形態では、T 細胞はサイトカイン誘導キラー細胞である。選択された実施形態では、T 細胞は C D 8 + T 細胞である。

#### 【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、T 細胞は天然に存在する T 細胞である。例えば、T 細胞は対象試料から単離してよい。一部の実施形態では、T 細胞は抗腫瘍 T 細胞 (例えば、腫瘍 (例えば、自己腫瘍) に対する活性を有し、抗原に応答して活性化され拡大増殖する T 細胞) である。抗腫瘍 T 細胞は、切除した腫瘍又は腫瘍生検から得た T 細胞 (例えば、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) ) 及びポリクローナル又はモノクローナル腫瘍反応性 T 細胞 (例えば、アフエレーシスにより得られた、自己又は人工抗原提示細胞により提示された腫瘍抗原に対してエクスピボで拡大増殖した) を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、T 細胞はエクスピボで拡大増殖される。

#### 【 0 0 5 6 】

一部の実施形態では、T 細胞は、外来性受容体又は外来性受容体をコードする核酸をさらに含む。一部の実施形態では、外来性受容体は、T 細胞受容体 ( T C R ) 又はキメラ抗原受容体 ( C A R ) である。

#### 【 0 0 5 7 】

外来性受容体は、任意の特定の抗原又はタンパク質を認識しこれに応答するその特異性により限定されない。そのような受容体は一般に、細胞内 T 細胞シグナル伝達モチーフに連結された特異的な抗原結合モチーフ (例えば、一本鎖抗体 ( s c F v ) ) を含む細胞外ドメインで構成されている。

#### 【 0 0 5 8 】

ある特定の実施形態では、T 細胞は、感染性疾患及び／又は自己免疫についての抗原 (

例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 炭水化物 - グルカン、C 型肝炎ウイルス E2 糖タンパク質、HIV エンベロープ糖タンパク質 gp120) を認識しこれに  
応答する外来性受容体を用いて遺伝子改変される。

【0059】

ある特定の実施形態では、T 細胞は、腫瘍抗原を認識しこれに応答する外来性受容体を用いて遺伝子改変される。本発明は、そのように認識される腫瘍抗原のタイプにより制限されない。本明細書で使用される用語「腫瘍抗原」とは、抗原が腫瘍又はがんに関連しているように、腫瘍細胞又はがん細胞により単独で又は主に発現される又は過剰発現される任意の分子 (例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、等) のことである。腫瘍抗原は、正常細胞、非腫瘍細胞又は非がん性細胞によりさらに発現されることが可能である。しかし、そのような場合、正常細胞、非腫瘍細胞又は非がん性細胞による腫瘍抗原の発現は、腫瘍又はがん細胞による発現ほど頑強ではない。これに関して、腫瘍又はがん細胞は、正常細胞、非腫瘍細胞又は非がん性細胞による抗原の発現と比べて、抗原を過剰発現する又は抗原を有意に高いレベルで発現することができる。その上、がん抗原は、異なる状態の発生又は成熟の細胞によりさらに発現されることが可能である。例えば、腫瘍抗原は胚期又は胎生期の細胞によりさらに発現されることがあり、その細胞は成人では通常見出されない。代わりに、腫瘍抗原は幹細胞又は前駆細胞によりさらに発現されることがあり、その細胞は成人では通常見出されない。

10

【0060】

腫瘍抗原は、いかなるがん又は腫瘍のいかなる細胞によって発現される抗原でも可能である。腫瘍抗原は、腫瘍抗原が 1 種類だけのがん又は腫瘍と関連している又は 1 種類だけのがん又は腫瘍を特徴とするように、1 種類だけのがん又は腫瘍の腫瘍抗原でもよい。代わりに、腫瘍抗原は 1 種類よりも多いがん又は腫瘍の腫瘍抗原でもよい (例えば、1 種類よりも多いがん又は腫瘍を特徴としてもよい)。例えば、腫瘍抗原は乳がん細胞と前立腺がん細胞の両方により発現されるが、正常な、非腫瘍又は非がん性細胞によっては全く発現されないことがある。

20

【0061】

例示的腫瘍抗原は、糖タンパク質 100 (gp100)、T 細胞 1 により認識されるメラノーマ抗原 (MART-1)、メラノーマ抗原遺伝子 (MAGE) ファミリーメンバー (例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12)、ニューヨーク食道扁平上皮癌 1 (NY-ESO-1)、血管内皮増殖因子受容体-2 (VEGFR-2)、神経膠腫関連抗原、癌胎児抗原 (CEA)、ベータ-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトタンパク質 (AFP)、レクチン反応性 AFP、サイログロブリン、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、前立腺特異的抗原 (PSA)、前立腺癌腫瘍抗原-1 (PCTA-1)、インスリン成長因子 (IGF)-I、IGF-II、IGF-I 受容体、腸カルボキシルエステラーゼ、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER-2)、メソテリン、及び上皮増殖因子受容体変異体 III (EGFR III) を含むがこれらに限定されない。

30

【0062】

腫瘍抗原を認識する受容体を含有するいかなる T 細胞も、本発明の T 細胞、組成物及び方法に用途がある。例は、CD19、CD20、CD22、受容体チロシンキナーゼ様オーバーファン受容体 1 (ROR1)、ジシアロガングリオシド 2 (GD2)、エプスタインバーウイルス (EBV) タンパク質若しくは抗原、葉酸受容体、メソテリン、ヒト癌胎児抗原 (CEA)、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP)、CD33/IL3R、チロシンタンパク質キナーゼ Met (c-Met) 若しくは肝細胞増殖因子受容体 (HGF-R)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、糖脂質 F77、上皮増殖因子受容体変異体 III (EGFRvIII)、NY-ESO-1、メラノーマ抗原遺伝子 (MAGE) ファミリーメンバー A3 (MAGE-A3)、T 細胞 1 により認識されるメラノーマ抗原 (MART-1)、GP1000、p53、又は本明細書に記載される他の腫瘍抗原から選択される抗原

40

50

を認識する受容体（例えば、天然の若しくは天然に存在する受容体、又は操作された T C R 若しくは C A R などの合成受容体を発現するように操作された受容体）を発現する T 細胞を含むがこれらに限定されない。

#### 【 0 0 6 3 】

一部の実施形態では、T 細胞は、キメラ抗原受容体（C A R）を発現するように操作される。所望の抗原（例えば、腫瘍抗原）に特異的に結合するいかなる C A R も本発明で利用しうる。ある特定の実施形態では、C A R は抗原結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、所望の抗原に特異的に結合する重及び軽鎖可変領域を含む一本鎖可変断片（s c F v）である。一部の実施形態では、C A R は、膜貫通ドメイン（例えば、T 細胞膜貫通ドメイン（例えば、C D 2 8 膜貫通ドメイン））及び 1 つ以上の免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（I T A M）を含むシグナル伝達ドメイン（例えば、T 細胞受容体シグナル伝達ドメイン（例えば、T C R ゼータ鎖））をさらに含む。一部の実施形態では、C A R は、1 つ以上の同時刺激ドメイン（例えば、T 細胞活性化を刺激する第 2 のシグナルを提供するドメイン）を含む。本発明は、同時刺激ドメインのタイプにより限定されない。実際、C D 2 8、O X 4 0 / C D 1 3 4、4 - 1 B B / C D 1 3 7 / T N F R S F 9、高親和性免疫グロブリン E 受容体ガンマサブユニット、F c E R I、I C O S / C D 2 7 8、インターロイキン 2 サブユニットベータ（I L R）又は C D 1 2 2、サイトカイン受容体共通サブユニットガンマ（I L - 2 R）又は C D 1 3 2、及び C D 4 0 を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知であるいかなる同時刺激ドメインも使用しうる。一部の実施形態では、同時刺激ドメインは 4 - 1 B B である。一部の実施形態では、同時刺激ドメインは C D 2 8 である。

10

20

#### 【 0 0 6 4 】

C A R は、抗原結合部分とも呼ばれる標的特異的結合エレメントを含みうる。部分の選択は、標的細胞の表面を定義するリガンドのタイプと数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の疾患状態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして働くリガンドを認識するように選択しうる。本発明の C A R における抗原部分ドメインに対するリガンドとして働きうる細胞表面マーカーの例は、ウイルス、細菌及び寄生虫感染症、自己免疫疾患並びに上記の通りのがん細胞と関連する細胞表面マーカーを含む。

#### 【 0 0 6 5 】

標的にされる所望の抗原に応じて、C A R は、所望の抗原標的に特異的な適切な抗原結合部分を含むように操作することができる。例えば、C D 1 9 が標的にされるべき所望の抗原である場合、C D 1 9 に対する抗体は、本発明の C A R 中への組み込みのための抗原結合部分として使用することができる。

30

#### 【 0 0 6 6 】

外来性受容体をコードする核酸は、D N A 又は R N A（例えば、m R N A）を含む場合がある。一部の実施形態では、核酸はベクターを含む。

#### 【 0 0 6 7 】

核酸は、構成的な、調節可能な若しくは誘導性の、細胞型特異的な、組織特異的な、又は種特異的なプロモーターを含みうる。転写を指示するのに十分な配列に加えて、プロモーターは転写を調節することに関与している他の制御エレメント（例えば、エンハンサー、K o z a k 配列及びイントロン）の配列も含みうる。構成的発現を駆動するのに有用である多くのプロモーター／制御配列は当技術分野で利用可能であり、例えば、C M V（サイトメガロウイルスプロモーター）、E F 1 a（ヒト伸長因子 1 アルファプロモーター）、S V 4 0（サル空胞ウイルス 4 0 プロモーター）、P G K（哺乳類ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター）、U b c（ヒトユビキチン C プロモーター）、ヒトベータ - アクチンプロモーター、齧歯類ベータ - アクチンプロモーター、C B h（チキンベータアクチンプロモーター）、C A G（ハイブリッドプロモーターは、C M V エンハンサー、チキンベータアクチンプロモーター、及びウサギベータ - グロブリンスプライスアクセプターを含有する）、T R E（テトラサイクリン応答エレメントプロモーター）、H 1（ヒトポリメラーゼ I I I R N A プロモーター）、U 6（ヒト U 6 低分子核プロモーター）及び同

40

50

類のものを含むがこれらに限定されない。発現用に使用できる追加のプロモーターは、限定せずに、サイトメガロウイルス (CMV) 中間初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTR、HIV-LTR、HTLV-1 LTR、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) LTR、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV) LTR、脾フォーカス形成ウイルス (SFFV) LTRなどのウイルスLTR、サルウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、単純ヘルペス tkウイルスプロモーター、EF1-イントロンありの又はなしの伸長因子1-アルファ (EF1-) プロモーターを含む。追加のプロモーターは、いかなる構成的に活性なプロモーターでも含む。代わりに、いかなる調節可能なプロモーターでも、その発現を細胞内部で調節できるように、使用しうる。

#### 【0068】

10

さらに、誘導性発現は、そのような分子をコードする核酸を誘導性プロモーター/調節配列の制御下に置くことにより達成することができる。当技術分野で周知のプロモーターは、金属、グルココルチコイド、テトラサイクリン、ホルモン、及び同類のものなどの誘導剤に応答して誘導することができ、本発明で使用するためにも想定されている。したがって、本開示は、当技術分野で公知であるプロモーター/調節配列であって、それに作動可能に連結された所望のタンパク質の発現を駆動することができる任意のプロモーター/調節配列の使用を含むことが認識されている。

#### 【0069】

本開示は、核酸を含有するベクター及びその核酸又はベクターを含有する細胞も提供する。

20

#### 【0070】

ある特定の実施形態では、本開示のベクターは、哺乳類発現ベクターを使用して哺乳類細胞において1つ以上の配列の発現を駆動することができる。哺乳類発現ベクターの例は、pCDM8 (Seed, Nature (1987) 329: 840頁、参照により本明細書に組み込む) 及びpMT2PC (Kaufmanら、EMBO J. (1987) 6: 187頁、参照により本明細書に組み込む) を含む。哺乳類細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は典型的には、1つ以上の調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、サルウイルス40に由来する及び本明細書で開示され当技術分野で公知である他のプロモーターである。他の適切な発現系は、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年の第16及び17章を参照されたい。前記文献は参照により本明細書に組み込む。

30

#### 【0071】

さらに、ベクターは、例えば、以下の：宿主細胞中の安定した又は一過性のトランスフェクタントの選択のための選択可能マーカー遺伝子；転写終結及びRNAプロセッシングシグナル；5' - 及び3' - 非翻訳領域；内部リボソーム結合部位 (IRES)、多用途マルチブルクローニング部位；並びにキメラ受容体の発現を評価するためのレポーター遺伝子のうちの一部又は全部を含有しうる。適切なベクター及び導入遺伝子を含有するベクターを作製するための方法は当技術分野では周知であり利用可能である。選択可能マーカーは、クロラムフェニコール耐性、テトラサイクリン耐性、スペクチノマイシン耐性、ネオマイシン、ストレプトマイシン耐性、エリスロマイシン耐性、リファンピシン耐性、ブレオマイシン耐性、熱順応カナマイシン耐性、ゲンタマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、トリメトプリン耐性、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、GPT；サッカロミセス・セレピシエのURA3、HIS4、LEU2及びTRP1遺伝子を含む。

40

#### 【0072】

細胞内に導入されると、ベクターは、自律複製配列若しくは染色体外遺伝因子として維持されることも又は宿主DNA内に組み込まれることもある。核酸は、いかなる適切な手

50

段によっても細胞に送達されうる。

【0073】

ウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子移入法を使用すれば、核酸を細胞中に導入することができる。そのような方法を使用すれば、核酸を培養中の細胞に、又は宿主生物に投与することができる。非ウイルスベクター送達システムは、DNAプラスミド、コスミド、RNA（例えば、本明細書に記載されるベクターの転写物）、核酸、及び送達媒体と複合体化した核酸を含む。

【0074】

ウイルスベクター送達システムは、DNA及びRNAウイルスを含み、これらのウイルスは細胞への送達後エピソームゲノム又は組み込みゲノムを有する。種々のウイルス構築物は、本核酸を細胞まで送達するのに使用しうる。ウイルスベクターは、例えば、ウイルスベクターは、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及び単純ヘルペスウイルスベクターを含む。そのような組換えウイルスの非限定的例は、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）、組換えアデノウイルス、組換えレンチウイルス、組換えレトロウイルス、組換え単純ヘルペスウイルス、組換えポックスウイルス、ファージ、等を含む。本開示は、レトロウイルス又はレンチウイルスなどの宿主ゲノムに組み込むことができるベクターを提供する。例えば、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1989年；Kay, M. A.ら、2001年 Nat. Med. 7(1): 33~40頁；並びにWalther W. 及びStein U. 2000年 Drugs、60(2): 249~71頁を参照されたい。前記文献は参照により本明細書に組み込む。

【0075】

本開示に従ったベクターは、細胞中に形質転換する、トランスフェクトする、又は他の方法で導入することができる。トランスフェクションとは、いかなるコード配列が実際に発現されようとそうでなかろうと、細胞によるベクターの取り入れのことである。数多くのトランスフェクション法、例えば、リポフェクタミン、リン酸カルシウム共沈殿、電気穿孔、DEAE-デキストラン処理、マイクロインジェクション、ウイルス感染及び当技術分野で公知の他の方法が当業者には知られている。形質導入とは、細胞中へのウイルスの進入及びウイルスベクターゲノムにより送達される配列の発現（例えば、転写及び/又は翻訳）のことである。組換えベクターの場合、「形質導入」とは一般に、細胞中への組換えウイルスベクターの進入及びベクターゲノムにより送達される目的の核酸の発現のことである。

【0076】

細胞にベクターを送達する方法は当技術分野では周知であり、DNA若しくはRNA電気穿孔、DNA若しくはRNAを送達するためのリポソーム若しくはナノ粒子などのトランスフェクション試薬；機械的変形によるDNA、RNA若しくはタンパク質の送達（例えば、Shareiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2013) 110(6): 2082~2087頁、前記文献は参照により本明細書に組み込む。）；又はウイルス形質導入を含みうる。一部の実施形態では、ベクターはウイルス形質導入により細胞に送達される。核酸は、プラスミド若しくはウイルスベクターなどのもっと大きな構築物の一部として、又は直接的に、例えば、電気穿孔、脂質媒体、ウイルス輸送体、マイクロインジェクション、及び微粒子銃（高速粒子照射）により送達することができる。

【0077】

さらに、ナノ粒子 - 及び脂質ベースの送達システムなどの送達媒体を使用することができる。送達媒体のさらなる例は、レンチウイルスベクター、リボヌクレオタンパク質（RNP）複合体、脂質ベースの送達システム、遺伝子銃、ハイドロダイナミック、電気穿孔又はヌクレオフェクションマイクロインジェクション、及び微粒子銃を含む。様々な遺伝子送達法が、Nayerossadatら、(Adv Biomed Res. 2012年；1: 27頁) 及びIbraheemら、(Int J Pharm. 2014年1月

10

20

30

40

50

1 日；459（1 - 2）：70～83頁）で詳細に考察されている。前記文献は参照により本明細書に組み込む。

【0078】

本明細書に記載される操作された T 細胞の集団を含む組成物も提供される。

【0079】

組成物は、任意選択的に、T 細胞疲弊を治療するための他の薬剤（例えば、ニボルマブなどの抗 PD - 1 チェックポイント阻害剤）などの少なくとも 1 つの追加の治療剤、又は T 細胞疲弊に関連する感染症若しくは疾患について対象を治療するのに使用される他の薬物（例えば、抗ウイルス、抗生物質、抗菌、又は抗がん薬）を含んでもよい。

【0080】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの追加の治療剤は、少なくとも 1 つの化学療法剤を含む。本明細書で使用される場合、用語「化学療法薬」、「化学療法剤」又は「抗がん薬」は、がん治療又は予防において使用される任意の小分子又は他の薬剤を含む。化学療法薬は、シクロホスファミド、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、ドキシソルピシン、ドセタキセル、ダウノルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチン、ダカルバジン、シスプラチン、パクリタキセル、塩酸ラロキシフェン、クエン酸タモキシフェン、アベマシクリブ、アフィニトール（エベロリムス）、アルベリシブ、アナストロゾール、パミドロネート、アナストロゾール、エキセメスタン、カベシタピン、塩酸エピルビシン、エリブリンメシレート、トレミフェン、フルベストラント、レトロゾール、ゲムシタピン、ゴセレリン、イクサベピロン、エムタンシン、ラパチニブ、オラパリブ、メゲストロール、ネラチニブ、パルボシクリブ、リボシクリブ、タラゾパリブ、チオテパ、トレミフェン、メトトレキサート、及びツカチニブを含むがこれらに限定されない。選択された実施形態では、化学療法薬はパクリタキセルを含む。

【0081】

組成物は、例えば、サイトカイン、ケモカイン及び他の生物学的シグナル伝達分子、腫瘍特異的ワクチン、細胞がんワクチン（例えば、GM - CSF 形質導入がん細胞）、腫瘍特異的モノクローナル抗体、自己及び同種幹細胞救済（例えば、移植片対腫瘍効果を増加するため）、他の治療抗体、分子標的療法、抗血管新生療法、治療意図を有する感染病原体（腫瘍局在化細菌などの）及び遺伝子療法を含むことができる。

【0082】

組成物は、薬学的に許容される担体を含んでもよい。用語「薬学的に許容される担体」とは、本明細書で使用される場合、非毒性、不活性固体、半固体若しくは液体充填剤、希釈剤、カプセル封入材、界面活性剤、サイクロデキストリン又は任意のタイプの補助製剤でも意味する。担体は、単一成分又は 2 つ以上の成分の組合せを含んでもよい。薬学的に許容される担体として働くことができる材料のいくつかの例は、ラクトース、グルコース及びサクロースなどのしかしこれらに限定されない糖、コーンスターチ及びジャガイモデンプンなどのしかしこれらに限定されないデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロースなどのしかしこれらに限定されないセルロース及びその誘導体；トラガント末；モルト；ゼラチン；タルク；カカオ脂及び坐薬ワックスなどのしかしこれらに限定されない賦形剤；落花生油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリブオイル、コーンオイル及びダイズ油などのしかしこれらに限定されないオイル；クレモフォール EL、クレモフォール RH 60、ソルトール HS 15 及びポリソルベート 80 などのしかしこれらに限定されない界面活性剤；アルファ - CD、ベータ - CD、ガンマ - CD、HP - ベータ - CD、SBE - ベータ - CD などのしかしこれらに限定されないシクロデキストリン；プロピレングリコールなどのグリコール；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのしかしこれらに限定されないエステル；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどのしかしこれらに限定されない緩衝剤；アルギン酸；無発熱物質水；等張食塩水；リンガー液；エチルアルコール及びリン酸緩衝液、並びに、ラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなどのしかしこれらに限定されない他の非毒性適合性潤滑油であり、調合者の判断に従って保存剤及び抗酸化剤も組成物中に存在

10

20

30

40

50

することができる。

【0083】

投与経路及び組成物の形態は、使用される担体のタイプを指示する。組成物は、例えば、全身投与（例えば、経口、直腸、鼻、舌下、頬側、移植片又は非経口注射）又は局所投与（例えば、経皮、肺、鼻、耳、目、リポソーム送達系、又はイオントフォレシス）に適した様々な形態であってよい。

【0084】

3. 治療T細胞を作製する方法

本開示は治療T細胞を作製するための方法を提供する。

【0085】

一部の実施形態では、方法は、T細胞の試料を得るステップ、T細胞のDNAを変化させて、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ、並びにT細胞を操作して、外来性受容体を発現するステップを含む。

【0086】

一部の実施形態では、方法は、T細胞を含む試料を得るステップ、T細胞のDNAを変化させて、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップ、及びT細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップを含む。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質若しくはSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arld1a、Arld2、Arld1b、Smarc b1、Smarc d2、Smarc a4、Smarc c1、又はその組合せである。一部の実施形態では、方法は、T細胞のDNAを変化させて、GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1及びELMSAN1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップをさらに含む。

【0087】

DNAを変更すれば、改変を含まない細胞と比べて、T細胞の疲弊を予防する又は減少する。したがって、DNAを変更すればT細胞の持続性及び機能を増加させ、それによって治療用途のためにT細胞を改善する。

【0088】

T細胞は、CD3+T細胞（例えば、CD4+とCD8+T細胞の組合せ）、CD8+T細胞、CD4+T細胞、ナチュラルキラー（NK）T細胞、アルファベータT細胞、ガンマデルタT細胞、又はその任意の組合せから選択しうる。一部の実施形態では、T細胞はメモリーT細胞（例えば、セントラルメモリーT細胞又はエフェクターメモリーT細胞）である。一部の実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球である。一部の実施形態では、T細胞はサイトカイン誘導キラー細胞である。選択された実施形態では、T細胞はCD8+T細胞である。

【0089】

一部の実施形態では、T細胞は天然に存在するT細胞である。例えば、T細胞は対象試料から単離してよい。一部の実施形態では、T細胞は抗腫瘍T細胞（例えば、腫瘍（例えば、自己腫瘍）に対する活性を有し、抗原に応答して活性化され増大するT細胞）である。抗腫瘍T細胞は、切除した腫瘍又は腫瘍生検から得たT細胞（例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL））及びポリクローナル又はモノクローナル腫瘍反応性T細胞（例えば、アフレーシスにより得られた、自己又は人工抗原提示細胞により提示された腫瘍抗原に対してエキスピボで拡大増殖した）を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、T

10

20

30

40

50

細胞はエクスピボで拡大増殖される。

【 0 0 9 0 】

T細胞のDNAを変化させて、少なくとも1つの遺伝子をノックアウト又は破壊するステップは、当技術分野で公知であり本明細書の他の場所に記載される方法を使用してよい。

【 0 0 9 1 】

T細胞を操作して、外来性受容体を発現させるステップは、外来性受容体を発現する細胞中に核酸をトランスフェクトする、形質転換する、又は他の方法で導入することを含む。そのような核酸を本明細書の他の場所に記載される細胞中にトランスフェクトする、形質転換する、又は他の方法で導入するための核酸及び方法は、開示された方法に適している。

10

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態では、外来性受容体は、T細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)である。外来性受容体は、任意の特定の抗原又はタンパク質を認識しこれに应答するその特異性により限定されない。ある特定の実施形態では、T細胞は、感染性疾患及び/又は自己免疫の抗原を認識しこれに应答する外来性受容体で遺伝子改変される。ある特定の実施形態では、T細胞は、腫瘍抗原を認識しこれに应答する外来性受容体で遺伝子改変される。

【 0 0 9 3 】

4. 治療方法

20

本開示は、疾患又は傷害を治療するための方法も提供する。

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、方法は、T細胞持続性及び機能性を促進する又は支持する少なくとも1つの遺伝子を欠くように改変されたT細胞の有効量を対象に投与することを含む。

【 0 0 9 5 】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される。

【 0 0 9 6 】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、クロマチン再構成タンパク質をコードしている。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又若しくはSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smrca4、Smrcc1、又はその組合せである。

30

【 0 0 9 7 】

本発明は、治療される疾患又は状態のタイプにより制限されない。T細胞の投与を介して治療可能であるいかなる疾患又は状態でも、本明細書に記載されるT細胞及びその組成物を使用すれば改善されたさらに効果的なやり方で治療することができる。

40

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、投与は、T細胞疲弊を阻害する又は減少させる(例えば、少なくとも1つの遺伝子が欠けているように操作されていない同じ量のT細胞(例えば、CAR T細胞又は外来性TCRを含むT細胞)を受ける対象と比べて)。一部の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又若しくはSWI/SNFファミリーメ

50

ンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smardc1、Smardc2、Smardc4、Smardcc1、又はその組合せである。

【0099】

一部の実施形態では、投与は、慢性抗原の存在下で改善されたT細胞生存及び/又は操作されていないT細胞と比べて改善されたT細胞持続性及び機能をもたらす。

【0100】

T細胞は、対象から単離されてよい。一部の実施形態では、T細胞は対象にとって同種である。一部の実施形態では、T細胞は対象にとって自己由来である。したがって、T細胞は、対象由来の試料から単離し、エキスピボで改変して拡大増殖させ、対象に戻してよい。

【0101】

一部の実施形態では、疾患又は障害はがんである。一部の実施形態では、疾患又は障害は感染性疾患である。本発明は、がんのタイプにより又は感染性疾患のタイプにより限定されることはない。実際、当技術分野で公知であり、治療にT細胞療法が使用されるいかなるがんも、本発明の組成物及び方法を用いて治療しうる。同様に、当技術分野で公知であり、治療にT細胞療法が使用されるいかなる感染性疾患も、本発明の組成物及び方法を用いて治療しうる。

【0102】

ある特定の実施形態では、本発明は、個人においてがんの悪化を治療する若しくは遅らせるための、又は感染性疾患の進行を治療する若しくは遅らせるための方法であって、本明細書に記載される操作されたT細胞又はその組成物の有効量を個人に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、治療は、治療の中止後個人での持続される応答を生じる。

【0103】

方法は、任意のがん細胞で又は、任意のタイプのがん、例えば、米国国立がん研究所により記載されるがんを有する対象において使用することができる。一部の実施形態では、がんは、細胞腫、肉腫、リンパ腫、白血病、メラノーマ、中皮腫、多発性骨髄腫又はセミノーマでもよい。がんは、膀胱、血液、骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸/直腸、子宮内膜、頭頸部、腎臓、肝臓、肺、筋肉組織、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、脾臓、胃、精巣、甲状腺又は子宮のがんでもよい。一部の実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。一部の実施形態では、がんは転移性がんである。

【0104】

本明細書に記載される方法は、がんの治療のために腫瘍免疫原性を増やすなどの増強された免疫原性が望ましい状態を治療するのに用途がある可能性がある。一部の実施形態では、組換え受容体（例えば、CAR及び/又はTCR）は、治療されているがんに特異的である。一部の実施形態では、組換え受容体（例えば、CAR及び/又はTCR）はすべてのがんに対して一般的である。

【0105】

ある特定の実施形態では、本発明は、治療有効量の開示された組成物を用いてがんを有する対象を治療することが非改変T細胞を用いたがんを有する対象の治療よりも優れていることを実証している。一部の実施形態では、開示されたT細胞又はその組成物の治療有効量を用いた治療により、がん細胞の発生又は成長が阻害される及び/又は集団としてのがん細胞は他の治療（例えば、がん治療薬又は放射線療法の細胞死誘発活性）に対してより感受性になる。したがって、本発明のT細胞、組成物及び方法は、単独療法（例えば、がん細胞を殺傷する、及び/又はがん細胞成長を低減する若しくは阻害する、アポトーシス及び/又はがん細胞中の細胞周期停止を誘導するための）として使用してもよく、又は

10

20

30

40

50

他の抗がん剤（例えば、細胞死誘導若しくは細胞周期破壊がん療法薬又は放射線療法）などの１つ以上の追加の薬剤（複数可）と組み合わせて投与される場合、がん治療薬若しくは放射線療法単独だけで治療される動物における対応する割合の細胞と比べて、がん細胞のより大きな割合を殺傷に対して感受性にし、がん細胞成長を阻害し、アポトーシス及び／若しくは細胞周期停止を誘導した。

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、個人は、１つ以上の他の形態の抗がん治療（例えば、化学療法、免疫療法、等）に対して抵抗性である（例えば、抵抗性だと実証されている）がんを有する。一部の実施形態では、抵抗性は、がん又は難治性がんの再発を含む。再発とは、治療後の最初の部位又は新たな部位でのがんの再出現のことでよい。一部の実施形態では、抵抗性は、化学療法を用いた治療中のがんの悪化を含む。一部の実施形態では、抵抗性は、化学療法薬を用いた伝統的な又は従来の治療に応答しないがんを含む。がんは、治療の初めに抵抗性のことがあり、又は治療中に抵抗性になることもある。一部の実施形態では、がんは初期段階である又は後期段階である。

10

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態では、改変Ｔ細胞及びその組成物は、１つ以上の従来のがん療法に対する抵抗性を特徴とするがん（例えば、化学療法抵抗性、耐放射線性、ホルモン耐性などのがん細胞）を治療する、寛解させる、又は予防するのに使用される。一部の実施形態では、治療は、抵抗性がん細胞の成長を徹底的に阻害する及び／又は集団としてのそのような細胞をがん療法薬又は放射線療法に（例えば、その細胞死誘導活性に）対してもっと感受性にしうる。

20

【 0 1 0 8 】

ある特定の実施形態では、治療有効量の改変Ｔ細胞組成物は、そのような治療に続いて対象でのがん細胞の数を減少させる。ある特定の実施形態では、治療有効量の改変Ｔ細胞組成物は、そのような治療に続いて対象での腫瘍負荷を減少させる及び／又は除去する。

【 0 1 0 9 】

広範囲の第二の療法は、本開示の方法と併せて使用しうる。第二の療法は、追加の治療薬の投与でもよく又は別の薬剤の投与とは関係のない第二の療法でもよい。そのような第二の療法は、手術、免疫療法、放射線療法又は追加の化学療法薬若しくは抗がん剤を含むがこれらに限定されない。

30

【 0 1 1 0 】

第二の療法は、単一組成物として又は最初の療法と実質的に同時に投与される別々の組成物で最初の療法と同時に投与してもよい。一部の実施形態では、第二の療法は、数時間から数か月に及ぶ時間間隔で第一の療法の治療に先行してもその後に続いてよい。

【 0 1 1 1 】

ある特定の実施形態では、方法は、対象に放射線療法を施すことをさらに含む。ある特定の実施形態では、放射線療法は、対象が治療有効量の改変Ｔ細胞組成物を受ける前に、それと同時に、及び／又はその後で施される。

【 0 1 1 2 】

ある特定の実施形態では、方法は、１つ以上の抗がん剤及び／又は１つ以上の化学療法剤を対象に投与することをさらに含む。ある特定の実施形態では、１つ以上の抗がん剤及び／又は１つ以上の化学療法剤は、対象が治療有効量の操作されたＴ細胞又はその組成物を受ける前に、それと同時に、及び／又はその後で投与される。ある特定の実施形態では、治療有効量の操作されたＴ細胞と一連の抗がん剤を用いて対象を併用治療すれば、操作されたＴ細胞又は抗がん薬／放射線単独で治療された対象と比べて、そのような対象においてより大きな腫瘍応答及び臨床的有用性を生み出す。すべての承認を受けた抗がん薬及び放射線治療についての用量は分かっているので、本発明は操作されたＴ細胞と抗がん薬及び放射線治療の種々の組合せを想定している。

40

【 0 1 1 3 】

一部の実施形態では、第二の療法は抗体の投与を含む。抗体は、腫瘍細胞により特異的

50

に発現される抗原又は正常細胞と共有される抗原を標的にしてもよい。一部の実施形態では、抗体は、例えば、CD20、CD33、CD52、CD30、HER (erbB又はEGFRとも呼ばれる)、VEGF、CTLA-4 (CD152とも呼ばれる)、上皮細胞接着分子 (EPCAM、CD326とも呼ばれる) 及びPD-1/PD-L1を標的にしうる。適切な抗体は、リツキシマブ、プリナツモマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、イブリツモマブ、トシツモマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ、ベルツズマブ、などを含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、追加の治療薬は、ベムプロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ及びイピリムマブを含むがこれらに限定されない抗PD-1/PD-L1抗体を含んでよい。抗体は化学療法薬にも連結されていてよい。したがって、一部の実施形態では、抗体は、抗体-薬

10

#### 【0114】

第二の療法の投与は、様々な方法によって対象に施されてよい。本明細書に記載される使用又は方法のいずれにおいても、投与は、限定せずに、それを必要とする対象への経口、吸入、静脈内、筋肉内、局所的、皮下、全身及び/又は腹腔内投与を含む、当業者には公知の種々の経路によるものでよい。

#### 【0115】

##### 5. T細胞疲弊を予防する方法

本開示は、操作されたT細胞の疲弊を予防する(例えば、過剰な抗原に曝露されたT細胞の機能性を維持する)方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1及びACTR8からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することを含む。一部の実施形態では、方法は、クロマチン再構成タンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子を欠くようにT細胞を遺伝子改変することを含む。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又若しくはSWI/SNFファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、INO80ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8、又はその組合せである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、cBAF複合体のメンバーである。一部の実施形態では、SWI/SNFファミリーメンバーは、Arid1a、Arid2、Arid1b、Smrca1、Smrca2、Smrca4、Smrcc1、又はその組合せである。

20

30

#### 【0116】

一部の実施形態では、方法は、操作されたT細胞をそれを必要とする対象に投与することをさらに含む。

#### 【0117】

「T細胞疲弊を予防する」とは、疲弊した状態の細胞と比べて、以下の：PD-1、TIM-3及びLAG-3のうちの1つ以上の減少した発現及び/又はレベル；増加したメモリー細胞形成及び/又はメモリーマーカー(例えば、CD62L)の維持；アポトーシスの予防；増加した抗原誘導サイトカイン(例えば、IL-2)産生及び/又は分泌；増強された殺傷能力；低表面抗原を有する腫瘍標的の増加した認識；抗原に応答しての増強された増殖；並びに抑制性受容体(例えば、プログラムされた細胞死1(PDCD1、PD1とも呼ばれる)及び細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA-4))のより低い発現のうちの1つ以上により特徴付けられるT細胞の維持された又は回復した機能性の状態のことである。

40

#### 【0118】

したがって、操作されたT細胞は、非改変T細胞と比べて、増加した機能性及び/又は活性(例えば、増加した抗原誘導サイトカイン産生、増強した殺傷能力(例えば、低い表面抗原を有する腫瘍標的の増加した認識)、増加したメモリー細胞形成及び/又は抗原に

50

応答しての増強された増殖)及び/又は疲弊の減少した特長(例えば、疲弊を示すマーカー又は抑制性受容体(例えば、PD-1、TIM-3、LAG-3)及び/又はプログラムされた細胞死のより低いレベル)を示しうる。治療的適用という文脈では、改変T細胞は、治療薬(例えば、CAR T細胞)の臨床的有効性を増強しうる。

#### 【0119】

一部の実施形態では、単離されたT細胞は、外来性受容体をコードする核酸をさらに含む。一部の実施形態では、外来性受容体は、T細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)である。T細胞を改変するための方法、開示されたT細胞並びにその組成物及び方法に関連して上に示される外来性受容体並びに核酸及びその標的抗原、対象、並びに疾患及び障害の記述は、操作されたT細胞の疲弊を予防する方法にも適用できる。

10

#### 【0120】

本明細書に開示される改変T細胞又は組成物の有効量は、治療される疾患のタイプ、改変T細胞のタイプ、疾患の重症度及び経過、個人の臨床状態、個人の臨床歴及び治療に対する応答、並びに担当医の裁量に基づいて決定しうる。

#### 【0121】

本明細書に記載される方法(例えば、疾患又は障害の治療)のいずれかの有効性は、臨床モデル又は臨床前モデルなどの当技術分野で公知の種々のモデルにおいて試験しうる。治療の有効性とは、生存を延ばすこと(全生存及び無進行生存を含む);客観的応答(完全奏功又は部分応答);又は疾患又は障害の徴候又は症状(例えば、がん又は感染性疾患)を改善することのうちのいずれか1つ以上のことでありうる。

20

#### 【0122】

一部の実施形態では、試料は、治療に対する応答を測定するためのベースラインとしてT細胞を用いた治療(例えば、単独で又は本明細書に記載される別の療法と組み合わせて)に先立って得られる。一部の実施形態では、試料は、組織試料(例えば、ホルマリン固定及びパラフィン包埋(FFPE)、保存、新鮮、又は凍結)である。一部の実施形態では、試料は全血である。一部の実施形態では、全血は、免疫細胞、循環腫瘍細胞及びその任意の組合せを含む。

#### 【0123】

いかなる例示的がんモデルでも、腫瘍を発症後、マウスは治療又は対照治療を受ける治療群に入れてよい。腫瘍サイズ(例えば、腫瘍量)は治療の経過中に測定され、全生存率もモニターされる。

30

#### 【0124】

一部の実施形態では、有効性とは、がん患者における腫瘍の状態、例えば、応答している、安定化している、又は悪化している、を決定するための公表されているRECISTガイドラインのセットに従って1つ以上の要因の改善のことでありうる。応答対象とは、そのがん(複数可)が、例えば、RECIST基準に基づく1つ以上の要因に従った改善を示す対象のことでありうる。非応答対象とは、そのがん(複数可)が、例えば、RECIST基準に基づく1つ以上の要因に従った改善を示さない対象のことでありうる。

#### 【0125】

有効性とは、1つ以上の免疫関連応答基準(irRC)の改善のことでありうる。一部の実施形態では、例えば、以降の評価時に放射線増悪について、新たな病変が定義された腫瘍負荷に加えられ、従われる。一部の実施形態では、非標的病変の存在は完全奏功の評価に含まれ、放射線増悪の評価には含まれない。一部の実施形態では、放射線増悪は、測定可能な疾患に基づいてのみ決定しうる及び/又は最初の文書化の日付から一定期間(例えば、4週間)に続いて連続評価により確認されてもよい。

40

#### 【0126】

##### 6. T細胞疲弊遺伝子を求めてスクリーニングする方法

本開示は、T細胞疲弊を促進する遺伝子を求めてスクリーニングすることも提供する。方法は、慢性又は急性刺激の条件下で少なくとも6日間T細胞を培養するステップであって、T細胞は少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンを含む、ステップ;

50

疲弊したT細胞表面表現型を示さないT細胞を単離するステップ；及び少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンを同定するステップを含む。一部の実施形態では、T細胞はT細胞ライブラリーであり、T細胞ライブラリーはT細胞のゲノム中のそれぞれの遺伝子について少なくとも1つのT細胞を含む。

【0127】

T細胞は、CD3+T細胞（例えば、CD4+とCD8+T細胞の組合せ）、CD8+T細胞、CD4+T細胞、ナチュラルキラー（NK）T細胞、アルファベータT細胞、ガンマデルタT細胞、又はその任意の組合せから選択しうる。一部の実施形態では、T細胞はメモリーT細胞（例えば、セントラルメモリーT細胞又はエフェクターメモリーT細胞）である。一部の実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球である。一部の実施形態では、T細胞はサイトカイン誘導キラー細胞である。選択実施形態では、T細胞はCD8+T細胞である。

10

【0128】

一部の実施形態では、T細胞は天然に存在するT細胞である。例えば、T細胞は対象試料から単離してよい。

【0129】

T細胞又はT細胞ライブラリーは、遺伝子スクリーニングについて当技術分野で公知である方法、例えば、RNAi、相補的DNA（cDNA）ライブラリー、又はCRISPR/Cas9-ベースのゲノム編集を使用して作製しうる。方法は、単一遺伝子ノックダウン又はノックアウトを別々に測定するように設計しうる。代わりに、方法は、組合せノックダウン又はノックアウトを測定するように設計しうる。

20

【0130】

一部の実施形態では、T細胞は、ガイドRNAのゲノムワイドライブラリーを用いて単一又は組合せCRISPR-Cas9-ベースの遺伝子ノックダウンを実施することにより作製される。したがって、ある特定の実施形態では、T細胞は、それぞれの細胞が少なくとも1つのガイドRNAを含むCRISPR-Cas9システムを使用して作製される。例えば、米国特許出願公開20190085324号を参照されたい。前記特許文献は参照によりその全体を本明細書に組み込む。

【0131】

CRISPR-Cas9システム、例えば、CRISPR-Cas9システムは、本明細書で使用される場合、細菌クラスター化規則的配置の短い回文配列リピート遺伝子座に由来する天然に存在しないシステムのことである。これらのシステムは一般に、酵素（Cas9タンパク質などのCasタンパク質）及び1つ以上のガイドRNAを含む。CRISPR-Cas9システムは、例えば、哺乳類細胞における最適使用のために、その中での最適送達のために、遺伝子編集における最適活性のために操作しうる。

30

【0132】

ガイドRNA（gRNA）は、crRNA、crRNA/tracrRNA（又は単一ガイドRNA、sgRNA）でもよい。用語「gRNA」、「ガイドRNA」及び「CRISPRガイド配列」は全体を通じて互換的に使用され、CRISPR-Cas9システムの結合特異性を決定する配列を含む核酸のことでありうる。gRNAは（部分的であれ完全であれ、相補的な）標的核酸配列（例えば、細胞のゲノム中の遺伝子）にハイブリダイズする。

40

【0133】

gRNA設計を促進するため、多くの計算ツールが開発されてきた（Prykhodzijaら、（PLoS ONE、10（3）：（2015））；Zhuら、（PLoS ONE、9（9）（2014））；Xiaoら、（Bioinformatics、Jan 21（2014））；Heigwerら、（Nat Methods、11（2）：122～123頁（2014））。ガイドRNA設計のための方法及びツールはZhuにより考察されている（Frontiers in Biology、10（4）289～296頁（2015）を参照されたい）。前記文献は参照により本明細書に組み込む。さらに

50

、sgRNAの設計を促進するのに使用できる、Genscript Interactive CRISPR gRNA設計ツール、WU-CRISPR及びBroad Institute GPP sgRNAデザイナーを含むがこれらに限定されない多くの公表されたソフトウェアツールがある。多くの種（ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、C.エレガンス）のゲノム内の多くの遺伝子及び位置を標的にする、IDT DNA Predesigned Alt-R CRISPR-Cas9ガイドRNA、Addgene Validated gRNA標的配列及びGenscriptゲノムワイドgRNAデータベースを含むがこれらに限定されない、公表され予め設計されたgRNA配列もある。

#### 【0134】

10

ゲノムワイドアプローチでは、適切なgRNAライブラリーを設計し構築することが可能である。そのようなgRNAは、ウイルスベクター送達などのベクター送達を使用して細胞まで送達しうる。CRISPR-Cas媒介攪乱の組合せは、単一細胞内部に複数のgRNAを送達することにより得てもよい。

#### 【0135】

慢性又は急性刺激の条件下で培養されたT細胞は、疲弊することがある。本明細書に記載されるように、疲弊T細胞表面表現型は、増加した濃度のPD-1、TIM-3及びLAG-3を含む。したがって、T細胞疲弊をもたらすいかなる刺激条件も、開示された方法で使用しうる。一部の実施形態では、慢性刺激の条件は、抗CD3被覆プレートを使用してT細胞を培養することを含む。一部の実施形態では、慢性刺激の条件は、IL-2の存在下で培養することをさらに含む。一部の実施形態では、急性刺激の条件は、IL-2の存在下でT細胞を培養することを含む。

20

#### 【0136】

培養は、T細胞疲弊の開始に必要ないかなる期間続いてもよい。一部の実施形態では、培養は少なくとも6日間である。一部の実施形態では、培養の持続期間は6～10日間（例えば、6日間、7日間、8日間、9日間又は10日間）である。一部の実施形態では、培養は10日間よりも長く続く。

#### 【0137】

T細胞は、慢性又は急性刺激の条件下での培養に先立って培養中に存在していてもよい。例えば、T細胞は、T細胞を慢性又は急性刺激の条件下に置くのに先立って、成長、再生又は遺伝子操作のため正常な培養条件下で培養してもよい。

30

#### 【0138】

疲弊T細胞表面表現型を示さないT細胞を単離することは、疲弊T細胞の同定及び/又は同定された細胞の分離を可能にするいかなる方法（複数可）でも含む。例えば、T細胞疲弊のマーカーのFACS分析は、本明細書の他の場所に記載されている通り、少なくとも1つの遺伝子ノックアウト又はノックダウンの同定に先立って非疲弊T細胞の同定及び除去を可能にする。

#### 【0139】

T細胞疲弊を促進する遺伝子を同定するため、疲弊表現型を示さないT細胞が単離され、ゲノムDNAが分析のために抽出される。分析は、ノックアウトされた遺伝子を判定するためにゲノムのシーケンシングを含みうる。CRISPR-Casスクリーンの場合、gRNAコード領域はPCR増幅を受け、配列決定され、gRNAライブラリーに位置付けられる。gRNAプロファイルを比較することにより、ノックアウトとT細胞疲弊の間の関連を判定することができる。

40

#### 【0140】

本開示は、本明細書に記載される方法のいずれかを実行するのに有用である、必要である、又は十分である1つ以上の試薬又は他の成分を含有するシステム又はキットをさらに提供する。システム又はキットは、外来性受容体試薬（核酸、ベクター、組成物、等）、トランスフェクション又は投与試薬、負及び正の対照試料（例えば、T細胞又は空のベクターDNA）、T細胞、遺伝子操作T細胞用のシステム（例えば、Casタンパク質、g

50

R N A、そのベクター、等)、追加の治療薬、容器(例えば、微量遠心機チューブ)、検出及び分析機器、ソフトウェア、説明書などを含んでよい。本明細書の他の場所で提供される核酸、ベクター、組成物、T細胞、追加の治療薬の記述は、開示されたシステム又はキットを用いた使用に適している。

#### 【0141】

一部の実施形態では、システム又はキットは、本明細書に記載される操作されたT細胞又は遺伝子操作T細胞用のシステムを含む。遺伝子操作T細胞用のシステムは、本明細書に記載されるように、クラスター化分散性短鎖反復回文配列(C R I S P R)/C R I S P R-関連タンパク質(C a s)システムを含んでよい。ある特定の実施形態では、遺伝子操作T細胞用のシステムは、C a sタンパク質(例えば、C a s 9、d C a s 9)、又はC a sタンパク質をコードする核酸、及びT細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子に向けられたg R N A、又はg R N Aをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、C a sタンパク質(例えば、C a s 9)及びg R N Aをコードする核酸は、同じ又は異なる核酸である。例えば、g R N AとC a sタンパク質は同じベクターから発現されうる。T細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子は、I N O 8 0 C、G A T A 3、A R I D 1 A、W D R 8 2、T R P 5 3、G P R 1 3 7 C、Z F P 2 1 9、H D A C 1、E L M S A N 1及びA C T R 8からなる群から選択されうる。T細胞疲弊を促進する少なくとも1つの遺伝子は、クロマチン再構成タンパク質をコードしうる。一部の実施形態では、クロマチン再構成タンパク質は、I N O 8 0ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質又若しくはS W I / S N Fファミリーメンバー、又はその組合せである。一部の実施形態では、I N O 8 0ヌクレオソーム位置決め複合体タンパク質は、A c t r 5、I n o 8 0、I n o 8 0 c、I n o 8 0 b、A c t r 8、又はその組合せである。一部の実施形態では、S W I / S N Fファミリーメンバーは、c B A F複合体のメンバーである。一部の実施形態では、S W I / S N Fファミリーメンバーは、A r i d 1 a、A r i d 2、A r i d 1 b、S m a r c b 1、S m a r c d 2、S m a r c a 4、S m a r c c 1、又はその組合せである。

#### 【0142】

一部の実施形態では、システム又はキットは、外来性受容体又はそれをコードする核酸をさらに含む。

#### 【0143】

一部の実施形態では、システム又はキットは、少なくとも1つの追加の治療薬をさらに含む。少なくとも1つの治療薬は、T細胞疲弊を治療するための薬剤；抗ウイルス薬；抗生物質；抗菌薬；化学療法薬；又はその組合せからなる群から選択してよい。

#### 【0144】

一部の実施形態では、システム又はキットは、システム又はキットの成分を使用するための説明書をさらに含む。説明書は、システム又はキットに係る関連資料又は方法論である。資料は、以下の：背景情報、成分の一覧表及びその在庫情報(購買情報、等)、システム又はキットを使用するための簡潔又は詳細なプロトコール、トラブルシューティング、参考文献、技術支援及び任意の他の関連文書のいかなる組合せでも含みうる。説明書は、システム若しくはキットと一緒に又は別々のメンバー成分として、書面として又はコンピュータ可読記憶装置上に供給される若しくはインターネットウェブサイトからダウンロードされてもよい電子的方式として、又は記録された提示として供給することができる。

#### 【実施例】

#### 【0145】

##### 材料及び方法

マウス すべてのマウスはJ A Xから調達された。野生型マウスはC 5 7 B L / 6 J マウス(J A X : 0 0 0 6 6 4)であった。C a s 9ノックインマウスは組織内で飼育された(J A X : 0 2 6 1 7 9)。O T - 1マウス(J A X : 0 0 3 8 3 1)をC a s 9マウスと交雑させた。R a g 1<sup>-/-</sup>マウスは組織内で飼育された(J A X : 0 0 2 2 1 6)

。

## 【0146】

一次T細胞単離及び培養 脾臓を収集し、70  $\mu$ Mフィルターを通してすりつぶした。RBCをACK溶解バッファー (Gibco) で溶解し、PBSでの洗浄前に6分間インキュベートした。細胞はカウントされ、次にMiltenyiプロトコールに従ってMACSバッファー (PBS + 0.5% BSA + 2  $\mu$ M EDTA) に再懸濁した。CD8 T細胞は、Miltenyi製のマウスCD8 T細胞単離キットを使用して濃縮し、次に10% FBS、1% ビルビン酸ナトリウム、1% 可欠アミノ酸、100 U Pen / Strept、50 nMのB-メルカプトエタノール (cRPMI) を有し10 ng / mlのマウスIL-2を補充されたRPMIに再懸濁した。細胞は、5  $\mu$ g / mlの抗CD3及び2  $\mu$ g / mlの抗CD28で被覆されたプレート上に100万細胞 / mlの濃度で播種した。細胞は、すべての実験の開始時に48時間これらの活性化プレート上に保持した。CD8<sup>+</sup> T細胞純度は、フローサイトメトリーにより確認した。細胞は2日ごとに継代し、1 mL当たり100万細胞で維持した。

10

## 【0147】

インビトロT細胞疲弊アッセイ T細胞疲弊を誘発するため、慢性刺激を、抗CD3被覆プレートを5  $\mu$ g / mLで使用して実施した (10 ng / ml IL-2の連続存在下)。細胞は2日ごとに新鮮な被覆プレート上に継代され、結果に記載される通りに6日目、8日目又は10日目に分析された。これとは対照的に、急性刺激された細胞は10 ng / ml IL-2単独で維持され、2日ごとに継代され、6日目、8日目又は10日目に分析された。

20

## 【0148】

サイトカイン産生の測定 T細胞はホルボールミリステートアセテート (Sigma、50 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) 及びイオノマイシン (Sigma、500 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) 又は3  $\mu$ g / mlのプレート結合抗CD3を用いて再刺激された。90分後、細胞はプレフェルジンAで処理してサイトカイン分泌を遮断した。次に、3時間後、細胞は、4 で20分間、表面マーカーについて染色され、同時にLive / Dead Blue Viability Dye (Thermo Fisher) で標識された。細胞は2度洗浄し、FoxP3固定 / 透過処理キット (Thermo Fisher) を使用して一晚固定した。次の日、細胞を洗浄し、室温で1時間細胞内サイトカインについて染色した。次に、細胞は3回洗浄し、LSR Fortessa machine (Beckman Dickinson) を使用して分析した。平均蛍光強度の分析はFlowJo v. 10.0を使用して実施した。実験はすべて少なくとも2つの生物学的複製で実施した。使用した抗体 (別段記述されなければ1対100で) は、TNF-PE (BioLegend、MP6-XT22、506306)、PD-1-PECy7 (BioLegend、RMP1-30、109110) IFN- $\gamma$ -FITC (BioLegend、XMG1.2、505806)、CD4-BV711 (BioLegend、RM4-5、100550) 及びCD8-BV786 (BioLegend、53-6.7、100750) であった。

30

## 【0149】

成長曲線 T細胞は記載される通りに活性化した。細胞はそれに続いて、10%のFBS、2 mMのL-グルタミン、5  $\mu$ Mの - ME及び10 ng  $\text{ml}^{-1}$ のIL-2を含む1 mLのRPMI-1640培地中5  $\times$  10<sup>5</sup>細胞で、プレート結合抗CD3 (3  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$ ) 有り (慢性) 及びなし (急性) で24ウェルプレートに蒔いた。実験期間中2日ごとに、細胞は収集され、細胞数は、75 ~ 4,000フェムトリットルの細胞容積ゲートを備えたBeckmann Coulter Counterを使用してカウントした。次に、細胞の50%を、1 mLの新鮮なT細胞培地に再び蒔いた。実験はすべて、少なくとも2つの独立した時間に実施した。

40

## 【0150】

インビトロ殺傷アッセイ ルシフェラーゼレポーターを発現するB16細胞に、37

50

で4時間言及された濃度でS I I N F E K Lペプチド ( I n v i v o g e n ) をパルスした。細胞は次に、2度洗浄され、以前記載された通りに急性に又は8日間の慢性刺激された $1 \times 10^5$  O T - 1トランスジェニックT細胞と一緒に、ウェル当たり $4 \times 10^4$ 細胞で蒔かれた。24時間の共培養後、細胞は溶解され、ルシフェラーゼ活性は製造業者の説明書によりルシフェラーゼアッセイキット ( P r o m e g a ) を使用して測定した。ルシフェラーゼ活性は、T細胞なしで培養された細胞に正規化された。

#### 【0151】

B 1 6 - 卵白アルブミンインビボ腫瘍モデル C 5 7 B L / 6 s c i d ( J a c k s o n 0 0 1 9 1 3 ) マウスに、P B S と M a t r i g e l ( C o r n i n g ) の1対1混合物中 $2 \times 10^5$  B 1 6 - O V A細胞を皮下注射した。5日後に、以前記載された通りに急性に又は慢性刺激された $2 \times 10^6$  O T - 1細胞を眼窩後注射によりマウスに養子性に移した。マウスは毎日モニターされ、病的状態の徴候があると殺傷された。

10

#### 【0152】

A T A C - s e q 試料処理及び分析 A T A C - s e q は、O m n i - A T A C プロトコル ( C o r c e s ら、2017年、N a t . M e t h o d s 14、959~962頁) を使用して実施された。手短に言えば、50,000生細胞をA T A C - s e q 直前にフローサイトメトリーにより精製した。溶解、核単離及び転位はO m n i - A T A C プロトコルに従って実施した。ライブラリーはシーケンシングのために調製され、I l l u m i n a N o v a S e q 上 $2 \times 75$ デュアルインデックスフォーマットで配列決定した。

20

#### 【0153】

F a s t q ファイルは、f a s t p を使用して整えられ、h i s a t 2 を使用してmm10ゲノムに整列させた。読取りデータは重複排除され、フィルターされ、重複排除されたA T A C - s e q 断片を含有するそれぞれの試料についてのb e d ファイルを作成した。それぞれの試料についてのピークはM A C S 2 を使用して個別に呼ばれ、次にその試料について大多数の複製に存在するピークに基づいて再生可能ピークにフィルターされた。すべての試料について設定されたユニオンピークは、それぞれの試料についての再生可能ピークを高信頼度非重複固定幅 ( 500bp ) ピークのセットに合併することにより構築し、これを使用して下流分析に使用する試料マトリックスによりピークを作り出した。差次的ピークは、D E S e q 2 ( L o v e ら、2014年) を使用して決定した。主成分分析は、' D E S e q 2 : : v a r i a n c e S t a b i l i z i n g T r a n s f o r m a t i o n ' 及び次に' s t a t s : : p r c o m p ' を使用して先ず正規化することによりピークマトリックスに関して実施した。それぞれの試料についての断片をR中にロードし、' r t r a c k l a y e r : : e x p o r t ' を使用して転写開始部位での読取りデータにより正規化されたb i g w i g ファイルを輸出することにより、ゲノムトラックファイルを作成した。カバー度ファイルは、I n t e g r a t i v e G e n o m i c s V i e w e r を使用して視覚化した。以前公表されたA T A C - s e q データ ( M i l l e r ら、2019年、N a t . I m m u n o l . 20、326~336頁) の解析では、f a s t q ファイルはa c c e s s i o n G S E 1 2 3 2 3 6 からダウンロードし、一貫性について開示されたパイプラインを使用して再処理された。ターミナル及びプロジェニターT E X A T A C - s e q ピークは、ターミナル対プロジェニターT E X 試料を比較する場合は、L o g 2 F C 1 のカットオフ及びF D R 0 . 0 5 でD E S e q 2 使用して計算された ( 指示通りに、T I L 試料又はL C M V 試料 ) 。公表されているデータとインビトロアッセイデータの間の重複しているピークの定量化では、すべての試料を包含するユニオンピークセットを作成し、再分析した。H O M E R モチーフ濃縮分析では、図24に示されるように、H O M E R f i n d M o t i f s G e n o m e コマンドラインユーティリティーを使用して、バックグラウンドピークセットと比べて指示されたピークセットにおいてピークに存在するモチーフを同定した。バックグラウンドピークセットでは、検討された試料のユニオンピークセットを使用し、その結果として、濃縮されたモチーフは、ランダムゲノム領域と比べたヒトT細胞で濃縮されたモチーフよりもむしろ、凝

30

40

50

集状態の試料と比べた差次的ピークセットで濃縮されたモチーフピークに対応する。

#### 【0154】

ゲノムワイド s g R N A ライブラリー レトロウイルスマウスゲノムワイド C R I S P R ノックアウトライブラリーは、Sarah Teichmann (Addgene # 104861) から贈呈された。ライブラリーは、電気穿孔により増幅しシーケンシングにより確かめた。

#### 【0155】

s g R N A プール設計及びクローニング

s g R N A ミニプールは、レンチウイルス骨格中へのクローニングのために以前開発されたプロトコルを使用して設計され、次に、レンチウイルス構築物 p M S C V (Flynnら、2021年、Cell 184、2394~2411頁) 中にサブクローニングされた。レンチ C R I S P R - v 2 は、Feng Zhang (Addgene プラスミド # 52961) から贈呈された。p M S C V - U 6 s g R N A (BbsI) - P G K p u r o 2 A B F P は、Sarah Teichmann (Addgene プラスミド # 102796) から贈呈された。

#### 【0156】

手短に言えば、標的遺伝子あたり6つの20bp可変 s g R N A 配列が、Broad Genetic Perturbation Platform (GPP) ゲノムワイド設計から得られ: s g R N A \_ \_ d e s i g n \_ \_ 1 0 0 9 0 \_ \_ G R C m 3 8 \_ \_ S p y o C a s 9 \_ \_ C R I S P R k o \_ \_ N C B I \_ \_ 2 0 2 0 0 3 1 7 ( d o t ) t x t ( d o t ) g z 、 p o r t a l s ( d o t ) b r o a d i n s t i t u t e ( d o t ) o r g / g p p / p u b l i c / d i r ? d i r p a t h = s g r n a \_ \_ d e s i g n でのオンラインで入手可能である。マウスゲノムについて設計された100個の非ターゲティング及び100個の単一ターゲティング負の対照ガイドも、Broad GPP webポータル由来であるが、含まれた。「G」がそれぞれの20bp配列の初めに加えられた。この21bp配列はBsmBI - v 2 酵素部位に次に2つの入れ子式PCRハンドルに隣接していた。プールされたオリゴはTwist Bioscienceにより合成された。オリゴは2ラウンドのPCRにより増幅され、レンチ C R I S P R - v 2 骨格はEsp3Iで一晩消化された。レンチ C R I S P R - v 2 中への増幅されたオリゴの1段階消化/ライゲーションは、1µLのT4リガーゼ、1µLのEsp3I、2µLのT4リガーゼバッファー、200ngの消化された骨格、及び50ngの増幅インサートを用いて20µLの反応物で37℃、1時間実施した。反応は65℃で15分間熱失活され、次に、1µLを、25µLのLucigen Enduraエレクトロコンポーネントセル及び0.1cmギャップキュベット付きのBioRad MicroPulserを使用して電気穿孔した。SOCでの1時間回収後、1000x希釈物を寒天プレート上に蒔いて、ライブラリーカバー度を確認した。残りは、150mLの液体培養で一晩培養し、次にmaxiprepにより精製した。最後に、プールは、PCRにより増幅された s g R N A 可変領域の Gibson Assemblyにより p M S C V 及び BbsI で予め消化された p M S C V 骨格中にサブクローニングした。電気穿孔は、上記の通りに繰り返した。ガイド表示はシーケンシングにより確かめた。

#### 【0157】

Broad GPP マウスゲノムワイド設計を使用するミニプールについて上に記載される通りに、s g R N A S W I / S N F ミニプール及び p e r t u r b - s e q についてのミニプールを遺伝子あたり4ガイドで設計した。S W I / S N F ミニプールは、50個の単一ターゲティングコントロールを含有し、P e r t u r b - s e q マイクロプールは12個の単一ターゲティングコントロールを含有していた。アニーリングによるクローニングのため、設計されたガイドあたり2個のプライマーが要求された。p M S C V ベクターはBbsIで消化した。プライマー対はすべて別々にアニールした。アニール産物は、等しくプールされ、希釈され、次に p M S C V 中にライゲートされた。増幅は、Stb13 化学的コンピテント細胞 (ThermoFisher C737303) を使用して

実施し、ライブラリーカバー度は、コロニー計数法、次にシーケンシングにより確かめた。

#### 【0158】

レトロウイルス作製及び形質導入 pMSCVプラスミドは、ポリ-D-リジンで被覆された15cm組織培養プレートにおおよそ80%培養密度でGP2-293細胞(Takara、RetroPack™ PT67細胞株)又は293T HEK細胞中にトランスフェクトした。ウイルス上澄みは、トランスフェクション後48時間及び72時間で収集し、0.45µm濾過ユニット(Millipore)により濾過した。濾過されたウイルスは、1500×gで45分間LentiX濃縮器(Takara)を使用して濃縮した。濃縮された上澄みはそれに続いて等分し、急速冷凍して、使用するまで-80

10

#### 【0159】

CD8 T細胞は、単離の24時間後濃縮されたレトロウイルスを形質導入された。4µg/mlのポリブレンをそれぞれのウェルに添加した。プレートは密封し、次に32で90分間1100×gで回転させた。スピンフェクション(spinfection)24時間後(例えば、2日目に開始して)細胞はフローサイトメトリーにより蛍光について調べ、2µg/mlのピューロマイシンを培地に添加した。

#### 【0160】

sgRNAライブラリー調製及びシーケンシング インビトロ長期培養からの試料では、生細胞は先ずFACSにより単離した。gDNAは市販のZymoキットを使用して抽出した。sgRNAライブラリーは、以前記載された通りに(Flynnら、2021年、Cell 184、2394~2411頁)、シーケンシングのために調製された。手短に言えば、標準3段階増幅プロトコルを使用した。第1に、pMSCVベクターに特異的なプライマーを使用して22サイクルのPCRでgDNAからsgRNAを増幅させた。反応あたり4µgまでのgDNAを有する100µLの反応物を使用し、反応の数はすべてのgDNAが使用されるまでスケールアップした。プラスミドプールのシーケンシングでは、この最初のPCRをスキップした。第2のPCRでは、0~7bpオフセットは、ライブラリーの多様性を増やすために8つのプールされたスタガープライマー(stagger primers)を使用してライブラリーの前部に付加した。PCR2プライマー標的部位は産物の特異性を改善するためPCR1のプライマー標的部位の内部に入れ子にした。最後に、PCR3では、インデックス配列を加えた。ライブラリーは、Illumina NextSeq又はNovaSeq上にデュアルインデックス1×75bp又は1×150bpフォーマットでシーケンスした。

20

30

#### 【0161】

大量のsgRNAスクリーニングデータ解析 sgRNAシーケンシングデータは、以前公表されたパイプライン(Flynnら、2021年、Cell 184、2394~2411頁)を使用して解析した。手短に言えば、fastqファイルは'fastp-f 10--max\_\_len1=50'を使用して整えられた。整えられた読取りデータは、sgRNA可変配列を取り、それをpMSCVベクター骨格中の隣接する配列の側面に並べることにより構築した関連するプール(ゲノムワイドプール又はミニプール)のカスタムfastaファイルに整列させた。整列は、--no-spliced-アライメントオプションを有するhisat2を使用して実施した。BamファイルはR中に読み込み、'Rsamtools::scanBam'を使用してガイドあたりのカウントに換算した。試料あたりのガイドの表は、R中に構築され、それぞれのカウントに1e6を掛け、その試料中の全カウントで割り、1を加算し、次にlog2正規化することにより正規化した。2つの条件(例えば、慢性対急性又は腫瘍対インプット)間の対数倍率変化が計算され、次に参照LFC平均を減算して、参照LFC標準偏差で割ることによりzスコア化した。ゲノムワイドスクリーンでは、ガイドはすべて参照として使用され(例えば、ガイドは他のすべてのガイドと比べてzスコア化された)、ミニプールスクリーンでは、コントロールガイドは参照として使用された。p値は、正規分布を使用してzスコア

40

50

から計算し、次にFDRは、R中の‘p.adjust’を使用して多重仮説検定を補正することにより計算した。Giniインデックス解析では、図19に示されるように、‘ineq’Rパッケージを使用した。

#### 【0162】

GO Term解析 図6C及び他の場所に示される遺伝子分類では、遺伝子セットは、TCR-KEGG\_\_T\_\_CELL\_\_RECEPTOR\_\_SIGNALING\_\_PATHWAY、クロマチン-GOCC\_\_CHROMATIN、インテグリン-GOBP\_\_INTEGRIN\_\_ACTIVATION、阻害性受容体-GOBP\_\_NEGATIVE\_\_REGULATION\_\_OF\_\_LYMPHOCYTE\_\_ACTIVATIONとして定義された。遺伝子リストは、手入力で、以下の遺伝子：クロマチン-ZFP219、TBX21、KDM6A、ELMSAN1、DNMT1P1、SETD1B、TADA2B、ZFP217、EOMES。インテグリン-ITGB3、APBB1IP、ITGAV。阻害性受容体-PDCD1を追加された。遺伝子セットエンリッチメント解析では、指示された遺伝子リストは、オンラインgProfilerツール(biit(dot)cs(dot)ut(dot)ee/gprofiler/gostで入手可能)にアップロードされた。

#### 【0163】

サイトスケープ相互作用ネットワーク 上位100の陽性ヒット及び上位20の陰性ヒットはサイトスケープ中に輸入された。エッジは、string-dbから収集された公知のタンパク質-タンパク質相互作用を輸入するため、stringAppサイトスケーププラグインを使用することにより作成した(Szklarczykら、2019年、Nucleic Acids Res. 47, D607~D613)。stringdbスコア0.75のカットオフを使用して、これらのタンパク質-タンパク質相互作用を濾過し、これは高信頼度相互作用のみを同定するための保存的カットオフを表す。ノードは、GO用語解析、細胞内局在及び/又は手動収集に基づいてグループ化された。少数の特徴付けが不十分な及び/又は切れ切れのノードを視覚化から取り除いた。

#### 【0164】

インビボCRISPR実験のための腫瘍接種及びT細胞養子移植 mCherry-卵白アルブミン融合構築物を異所的に発現するB16細胞のMC-38は、マトリゲルとPBSの1対1混合物に再懸濁することにより注射用に調製した。腫瘍あたり $1 \times 10^6$ 細胞を、Rag1<sup>-/-</sup>マウスの側腹部に皮下注射した(マウスあたり2つの腫瘍)。腫瘍は3日ごとに測定した。Cas9-OT-1 CD8<sup>+</sup> T細胞にsgRNAプール又は個々のsgRNAを形質導入し、上記の通り、4日間ピューロマイシンを用いて選別した。次に、T細胞は担がんマウスに静脈内注射された。インビボ競合アッセイでは、細胞は注射直前に混合された。T細胞注射の9日後、脾臓及び腫瘍をそれぞれのマウスから収穫した。

#### 【0165】

組織処理及び腫瘍浸潤リンパ球の単離 腫瘍は秤量し、次に小片に細かく切り刻んだ。腫瘍はgentleMACS Cチューブに移し、収載されたソフト/ミディアム腫瘍プログラムを使用するgentleMACS octoディソシエーターを用いてプロトコール推奨酵素混合物で消化した。次に腫瘍懸濁液は70µMフィルターで濾過し、その後RBC溶解にかけた。脾臓はすりつぶされ、70µMの濾し器で濾過され、次にRBC溶解バッファーで処理された。大量のsgRNAシーケンシング及びperturb-seqでは、腫瘍浸潤リンパ球又はT細胞は、FACSにより腫瘍又は脾臓から単離した。試料は、MACSバッファーで2回洗浄し、氷上で30分間染色した。CD8+BFP+細胞はフローサイトメトリーにより単離した。

#### 【0166】

個々のsgRNA増殖の確認のための競合アッセイ pMSCVレトロウイルスベクターを改変して、BFP-ピューロマイシン融合物をVEX-ピューロマイシン融合物で置き換えた。個々のガイドは、上記の通りに、プライマーの対をアニールすることによりク

ローニングした。使用された *Arid1a*-1 sgRNA 配列は、G C A G C T G C G A A G A T A T C G G G (配列番号 2) であり、使用された *Arid1a*-2 配列は、C A G C A G A A C T C G C A C G A C C A (配列番号 3) であった。使用された CTRL sgRNA 配列は C T T A C T C G A C G A A T G A G C C C (配列番号 4) であった。腫瘍処理は、インビボ確認のため上記の通りに実施した。

#### 【0167】

*Arid1a* ターゲティング sgRNA の確認 分解によるインデルのトラッキング (TIDE) : ゲノム DNA は市販のキット (Zymo Cat # D3025) を使用して形質導入された細胞から単離された。PCR 反応は、予想される編集部位を取り囲むプライマー及び 50 ng のインプット DNA を用いて実施した。PCR 条件は、98 で 30 秒、続いて 98 10 秒、60 で 10 秒間アニーリング、72 で 25 秒間を 35 サイクル、次に 72 で 2 分間であった。PCR アンプリコンは、市販の Zymo DNA クリーンアップキットを用いて精製して、サンガー配列決定した。編集の定量化は、オンラインツール tide (dot) nki (dot) nl を使用して実施した。

#### 【0168】

ウェスタンブロット : タンパク質ライセートは、放射性免疫沈降法 (RIPA) バッファースystem (Santa Cruz, sc-24948) を使用して指示された sgRNA を形質導入されたマウス T 細胞から調製した。タンパク質濃度は、ピシンコニン酸 (BCA) アッセイ (Pierce, ThermoFisher 23225) を使用して定量した。試料あたり 20 µg のタンパク質を負荷し、4 ~ 12 % Bis - Tris PAGE ゲル (NuPAGE 4 ~ 12 % Bis - Tris Protein Gel, Invitrogen) 上に流し、フッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilon-FL, EMD Millipore) 上に移した。膜は、室温で 1 時間 PBST 中 5 % ミルクを用いてブロックし、4 で一晩、*Arid1a* (ウサギ、1 対 1000、細胞シグナル伝達、12354S : Lot 4)、*Arid1b* (マウス、1 対 1000、Abcam、ab57461 : Lot GR3345290-4)、*Smarca4* (ウサギ、1 対 1000、細胞シグナル伝達、49360S : Lot 3) 及び *Tbp* (マウス、Abcam、ab51841 : Lot GR3313213-3) に対する一次抗体と一緒にインキュベートした。膜は PBST で 3 回洗浄し、次に、近赤外フルオロフォア-コンジュゲート種特異的二次抗体 : ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (IRDye 680RD、1 対 10,000、LI-COR Biosciences、926-68070) 又は ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (IRDye 800CW、1 対 10,000、LI-COR Biosciences、926-32211) と一緒に室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体適用に続いて、膜は PBST で 3 回洗浄し、次に LI-COR Odyssey CLx 撮像システム (LI-COR) を使用して撮像した。タンパク質バンド強度は、一体型バックグラウンド補正及び *Tbp* 対照への正規化を備えた Image Studio Lite (LI-COR) を使用して定量化した。*Tbp* に正規化された *Arid1a* レベルを比較する統計分析は、Dunnett's 多重比較検定 on Prism (v9.2.0) を使用して実施した。

#### 【0169】

一次ヒト T 細胞でのインビトロ実験 T 細胞拡大増殖及び生存能アッセイ : T 細胞は、T 細胞対抗 CD3 / 28 Dynabeads (Invitrogen) を 1 対 3 比で 4 日間活性化した。T 細胞拡大増殖アッセイは、培養培地中 IL-2 を 10 ng / mL で実施した。細胞数及び生存能測定値は、CellTaca Mx 自動細胞カウンター (Nexcelom) を使用して得た。細胞は、アクリジンオレンジ及びヨウ化プロピジウムで染色して、生存能を評価した。

#### 【0170】

標的化 CRISPR 遺伝子編集 : リボヌクレオタンパク質 (RNP) は、2' - O - メチルホスホロチオエート修飾を有する合成 sgRNA (Synthego) を 100 µM で TE バッファーに希釈して使用して調製した。5 µl の sgRNA は、2.5 µl の D

10

20

30

40

50

uplex Buffer (IDT) 及び  $2.5 \mu\text{g}$  の Alt-R S.p. Cas9 クレアーゼ V3 (IDT) と一緒に室温で 30 分間インキュベートした。100  $\mu\text{l}$  の反応物は、10,000,000 個の T 細胞、90  $\mu\text{l}$  の P3 バッファー (Lonza) 及び 10  $\mu\text{l}$  の RNP で組み立てられた。細胞は、P3 一次細胞 4D-Nucleofactor キット及び 4D Nucleofactor システム (Lonza) を使用してプロトコール EO115 でパルスした。細胞は、直ちに温培地で 6 時間回収した。ガイド配列: AAVS1-sg1 5' GGGGCCACUAGGGACAGGAU 3' (配列番号 5)、ARID1A-sg58 5' CCUGUUGACCAUACCCGCGUG 3' (配列番号 6)、ARID1A-sg60 5' UGUGGCGUGCUGCUGCAUACGA 3' (配列番号 7)。

10

#### 【0171】

標的化 CRISPR 遺伝子編集の評価: 編集の 4~7 日後、ゲノム DNA は Quick Extract DNA 抽出溶液 (Lucigen) を用いて抽出し、切断部位に隣接する約 500 bp 領域は、Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (New England Biolabs) を製造業者の説明書に従って用いて増幅させた。サンガーシーケンシングトレースは、CRISPR 編集の推論 (ICE) により分析した。

#### 【0172】

インビボでの一次ヒト T 細胞におけるプールされた CRISPR スクリーン 標的遺伝子あたり 2 つの sgRNA の sgRNA ライブラリー及び 8 つの負の対照のレンチウイルス形質導入と並行して、2 人のドナー由来の活性化されたヒト T 細胞をレンチウイルスにより形質導入して NY-ESO 特異的 TCR を発現させた。形質導入の 24 時間後、以前記載された通りに (Shifrutら、2018 年、Cell 175、1958~1971.e15)、細胞に Cas9 タンパク質を電気穿孔した。電気穿孔後、T 細胞は完全 X-ビボ 15 培地で拡大増殖させ、2 日ごとに分割し、IL-2 を 50 U/ml で補充した。以前記載された通りに (Rothら、2020 年、Cell 181、728~744.e21)、7 日目に、ドナーあたり 2 頭の NSG マウスに  $1 \times 10^6$  の A375 細胞を皮下注射した。 $1 \times 10^6$  の TCR 陽性 T 細胞は、後眼窩注射により 7 日後にマウスに移植した。以前記載された通りに (Rothら、2020 年、Cell 181、728~744.e21)、腫瘍及び脾臓は T 細胞移植の 7 日後に収集し、単一細胞浮遊液まで加工した。T 細胞は CD45 染色により選別し、gDNA は市販のキットを使用して抽出した。ライブラリー調製、次世代シーケンシング及び分析は、以前記載された通りに (Shifrutら、2018 年、Cell 175、1958~1971.e15) 実施した。それぞれのマウスの脾臓及び腫瘍中のガイドの量を使用して、それぞれのガイドの log 倍率変化を計算し、MAGeCK スコアはデフォルトパラメータを用いて計算した。

20

30

#### 【0173】

直接捕獲 Perturb-seq Feature Barcoding 試薬及びプロトコール付の 10x Chromium Next GEM シングルセル V(D)J 試薬キット v1.1 5' scRNA を、単一細胞での sgRNA の直接捕獲と互換性があるように適応させた。プロトコールの修正はここに要約している。段階 1、GEM Generation 及び Barcoding では、5 pmol のプライマー KP\_\_bead\_\_sgRNA\_\_RT は反応物中に添加され、液滴での sgRNA の捕獲及び次に sgRNA の逆転写が可能になった。3.2 B 段階、細胞表面タンパク質ライブラリーのための上澄みクリーンアップは、sgRNA ライブラリーを単離するために実施した。最後に、2  $\mu\text{L}$  の 3.2 B 段階の産物は、3 ラウンドの PCR を使用して増幅し、標識を付けた。250 bp のライブラリーはアガロースゲルにより精製し、10x プロトコールガイドラインに従って、26x91 フォーマットで遺伝子発現 (GEX) ライブラリーと一緒に配列決定した。図 23B に示される Perturb-seq 複製試料では、それぞれの複製は個々の腫瘍又は 1 つの試料に組み合わせられた同じマウス由来の 2 つの腫瘍を表す。同じマウス由来の腫瘍は、細胞収率が、捕獲あたり 10,000 細胞の標的化回収に対して 10x ガ

40

50

イドラインのかなり下である場合は、組み合わせられた。細胞収率が、10,000細胞の回収に必要な量のかなり上である場合は、ある特定の場合では、試料は複数の10×捕獲に分割されて細胞収率を最大にした。複数の捕獲に分割された試料は計算的に合併され、別々の複製として数えなかった。

#### 【0174】

Fastqファイルは10×cellrangerカウントパイプラインを使用して処理し、フィーチャーバーコード分析はGEXライブラリーとsgRNAライブラリーと一緒に処理することができる。mm10リファレンストランスクリプトームはGEXライブラリー用に使用した。sgRNAライブラリーでは、それぞれのガイドの可変配列（ガイドはリード2の一部として配列決定されたので逆相補配列に変換された）、ガイドID及び標的遺伝子を含むフィーチャーリファレンススプレッドシートが構築された。「遺伝子発現」と「CRISPRガイド捕獲」の両方についての濾過されたマトリックスは、下流分析のためにSeurat中にロードされた（Haoら、2021年、Cell 184、3573～3587頁）。Seurat「IntegratedData」ユーティリティを使用して、2つの独立した実験から試料を合併させた。

#### 【0175】

sgRNAを細胞に割り当てるため、生のz-スコアを「CRISPRガイド捕獲」マトリックスについて計算した。X-スコアは、それぞれのsgRNAが同じ細胞で検出された他のsgRNAと比べてどれほど濃縮されていたかを定量化するために計算された。z-スコアの差も、最も濃縮されたsgRNAと第2に濃縮されたsgRNAの間で計算された。最大sgRNA z-スコア 5及びz-スコア差 2を有する細胞は最大z-スコアを有するガイドを含むと判定され、sgRNA数のない細胞は「ノーガイド」と割り当てられ、他の細胞は「マルチガイド」と割り当てられた。ガイド割り当ては、下流処理のためSeuratメタデータに加えられた。スーラ細胞周期スコアリングを使用して、それぞれの単一細胞の細胞周期段階を予測した。ボルケーノプロット分析では、著しく差次的な遺伝子はFDR < 0.05と同定された。異なる遺伝子セットの攪乱のわたる比較では、平均log<sub>2</sub> FC > 0.1又は平均log<sub>2</sub> FC < -0.1の追加倍率変化カットオフが適用された。cBAFとINO80複合体内の共有される「アップ」及び「ダウン」遺伝子セットのカテゴリー化では（図16D～16Eに示される分析）、それぞれの複合体内の著しく差次的な遺伝子の和集合は合計され、次にそれぞれのサブユニットについての「アップ」及び「ダウン」遺伝子は、LFC > 0又はLFC < 0とだけ定義された。この戦略は、それぞれの攪乱について収集された細胞の量が異なり、FDR < 0.05閾値に到達するこうして得られる検出力に差があるにもかかわらず遺伝子セットを比較するために選択された。スーラ遺伝子モジュールスコアリングを使用して、LCMV遺伝子セット（LCMVクラスターあたり上位100マーカー遺伝子からなる）をperturb-seqデータベースでのそれぞれの細胞について遺伝子モジュールスコアに変換した。図24に示されるように、遺伝子モジュールスコアリングを使用して上方調節及び下方調節遺伝子セットを、拡大増殖したLCMVデータセットでもそれぞれの細胞についてのモジュールスコアに変換した。

#### 【0176】

##### [実施例1]

##### インビトロモデルでのT細胞疲弊

T細胞疲弊のゲノムワイドCRISPR/Cas9スクリーニングを受け入れることができるアッセイを開発するため、抗CD3抗体を使用してT細胞共受容体、CD3のクラスター化を増強し、それによって、抗原非依存的に慢性TCRシグナル伝達を誘導した（図1A）。このモデルは、T細胞疲弊-TCR複合体を通じた慢性刺激-のコア決定因子を単離し、T細胞局在化及び輸送効果、並びに腫瘍微小環境における免疫抑制因子を取り除き、こうしたことは特定のインビボモデルに特異的である可能性がある。重要なことに、このアッセイはスケーラブルであり、10<sup>8</sup>細胞を上回る培養を可能にし、ゲノムワイドCRISPR sgRNAライブラリーの1,000×カバー度を可能にする。8日間

の抗CD3刺激(2日間の抗CD3抗CD28活性化の後)にわたって、最初の活性化後さらなる刺激なしで継代された細胞と比べて、抑制性受容体であるPD-1及びTIM3の進行性上方調節並びに慢性刺激されたT細胞での増殖異常が確かめられた(急性刺激;  $p < 0.0001$ 、対応のないt検定; 図1B及び6A~6B)。慢性刺激されたT細胞は、急性刺激された細胞と比べて、酢酸ミリスチン酸ホルボール及びイオノマイシンを用いた再刺激後IFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ の分泌の欠損も示した(急性: 80% IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  +、慢性: 1% IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  +、図6C及び18A)。OT-1 T細胞とルシフェラーゼを発現し同族ペプチド抗原であるSIIINFEKL(配列番号1)でパルスされたB16腫瘍細胞の共培養により、慢性刺激された細胞がインビトロでの腫瘍殺傷において障害されていることも実証された(図6D)。最後に、B16-OVA腫瘍を担持するマウス中への慢性刺激されたOT-1 T細胞の移植により、急性刺激されたT細胞の移植と比べて、インビボでの減少した腫瘍管理が示された(移植の20日後の平均腫瘍サイズ:  $1,849.6 \text{ mm}^3$  (慢性)又は $755.0 \text{ mm}^3$  (急性);  $p = 0.005$ 、対応のないt検定; 図6E)。

10

#### 【0177】

シーケンシング(ATAC-seq)を用いたトランスポサース到達可能クロマチンについてのアッセイを慢性刺激の間2日ごとに実施し、網羅的クロマチン到達可能プロファイル进行分析した。ATAC-seqプロファイルの主成分分析(PCA)により、PC1はナイーブ細胞(0日目)を他のすべての試料から分離し、PC2は慢性刺激の間T細胞の進行性エピジェネティック分極化をとらえたことが示された(図1C)。Pdcd1及びEntpd1を含む個々の遺伝子座の分析により、既知の疲弊特異的調節エレメントでの到達性の増加が示された(図1D)。腫瘍及び慢性感染症からの参照T細胞疲弊データに対するインビトロ刺激された細胞の網羅的エピジェネティック類似性を評価した。「ターミナル疲弊ピークセット」は、前駆体疲弊T細胞と比べて、ターミナル疲弊したT細胞では特異的に活性なATAC-seqピークとして定義した。3,537のターミナル疲弊ATAC-seqピークがB16メラノーマ腫瘍モデルで同定され、2,346のピークがリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)慢性感染症モデルで同定された(Log2FC = 1; FDR = 0.05; 図1E及び6F)。それぞれのモデルでのターミナル疲弊ピーク到達性とインビトロ疲弊ATAC-seqデータの比較により、インビトロアッセイがインビボで観察される網羅的エピゲノム変化を厳密に再現することが実証され、腫瘍でのATAC-seqピークの88.6%及び慢性感染症でのATAC-seqピークの70.1%が10日目のインビトロモデルでの到達性の共有される増加を示した(図1E、6F及び18B~18C)。対照的に、TILで同定された2,926の前駆体TEXピークの分析により、これらの部位が繰り返される刺激で到達性の減少を示すことが実証された(図6F、18B~18C)。転写因子(TF)結合部位でのクロマチン到達性は、chromVARを使用して評価され、chromVARは、Batf、Fos、Jun及びNr4aを含む、ターミナル疲弊と以前関連していたTFモチーフが10日目インビトロで高度に到達可能であることを示した。さらに、ナイーブ及び前駆体疲弊関連Lef1及びTcf7モチーフでの到達性並びにNF- $\kappa$ B及びNfatモチーフの初期動的到達性の進行性消失が観察され、インビボでのT細胞疲弊において観察されたTF活性の進行を反映していた(図1F)。

20

30

40

#### 【0178】

##### [実施例2]

T細胞疲弊に関与している遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

インビトロ疲弊アッセイは、Rosa26-Cas9ノックインマウスを使用することによりCRISPRスクリーニングに適合性のあるように適応させたが、このマウスはCas9-P2A-EGFPを構成的に発現する(図2A)。T細胞単離の24時間後、Cas9+CD8+T細胞には、90,230のsgRNAを含むゲノムワイドレトロウイルスsgRNAライブラリーを形質導入した。形質導入された細胞の十分な遺伝子編集及びピューロマイシン選択のための時間を与えるため、活性化と慢性刺激の開始の間に48

50

時間遅延を導入した。この修正慢性刺激プロトコールは、抗CD3又はPMA/IOでの再刺激後にサイトカイン産生に類似する欠損を引き起こした(図19A~19B)。慢性刺激の存在下で適応度を特異的に調節した遺伝子を同定するため、細胞は4日目に急性(IL-2のみ)と慢性(抗CD3及びIL-2)刺激条件に分割し、両プールは10日目に配列決定した(図2A)。複製スクリーンが調製され、(1)細胞の単一sgRNAターゲティングを最適化するため低感染多重度(MOI)でのT細胞の形質導入(複製1:16.9% sgRNA+細胞、MOI=0.18;複製2:29.3% sgRNA+細胞、MOI=0.35;図7A)、及び(2)慢性培養の10日目の細胞表面表現型分析を使用するT細胞疲弊を確かめた(図7B)。それぞれの条件でのガイド表示を分析した: プラスミドライブラリー設計に存在する90,230のsgRNAのうち、>99%がそれぞれの急性試料において回収された(急性複製1:89,324(99.0%);急性複製2:89,625(99.3%);ジニ指数平均:0.39;図7C及び19C)。「慢性」試料は、選択圧のより多くの証拠を示し、より広範囲に及ぶガイド数及びスクリーンから離脱するより多数のガイドを有している(慢性複製1:検出された75,776 sgRNA(83.9%);慢性複製2:検出された87,524のsgRNA(97.0%);ジニ指数平均:0.64;図7C及び19C)。急性及び慢性条件でのそれぞれのsgRNAについて観察された数を比較すると、慢性条件で劇的に濃縮されたsgRNAの小集団との正の相関関係が明らかになった(図7D)。

10

#### 【0179】

スクリーンについての正の対照はTCRシグナル伝達経路の成分である。なぜならば、これらの因子をノックアウトすると、抗原駆動(又は抗CD3駆動)シグナル伝達が妨げられ、したがって、疲弊が予防されるからである。したがって、CD3受容体サブユニット(Cd3e、Cd3d、Cd3g、Cd247、図7D)の濃縮が分析され、これらの遺伝子を標的にするガイドの頑強な濃縮が両方の複製で観察された。以前記載されたように(Flynnら、(2021)Cell 184、2394~2411頁)、カウントテーブルは正規化され、z-スコアがそれぞれのsgRNAについて計算し、これらのsgRNAレベルz-スコアはそれぞれの遺伝子についてz-スコアに合併された。複製を合併すると、それぞれの遺伝子についての全体的z-スコア及びランキングが得られた(「ヒット」はFDR<0.001に対応する;図2B及び2C)。このアプローチは、2つの追加の広く採用されたCRISPR sgRNA濃縮分析法、MAGeCK及びcasTLEから得られたスクリーンヒットを比較することにより確認され、これらの方法は効果量推定間に高い相関関係を示した(casTLE効果量相関関係:R=0.66;MAGeCK log倍率変化相関関係:R=0.77;図20A~20D)。それぞれの方法を使用してヒットとして分類された遺伝子の比較により、ヒットの最大のグループが3つの方法全てにより共有されていることが明らかにされた(「ヒット」は、パイプライン及びMAGeCK又はcasTLEスコア>10についてFDR<0.05に対応する;図20B)。レトロウイルスライブラリーツールは対照sgRNAセットを含まず、正規化戦略(プール中のすべてのsgRNAと比べる)は、T細胞において発現されないし機能すると予測されていないsgRNAターゲティング臭覚受容体のセットを利用する戦略と比べた(Gilbertら、2014年、Cell 159、647~661頁)。臭覚受容体sgRNAセットにsgRNA濃縮を正規化すると、スクリーン結果の検出力を適度にブーストしたが、他の点では結果に最小限の影響しかなかった(図20E)。

20

30

40

#### 【0180】

Cd3e、Cd3d及びCd3gに加えて、スクリーンでの上位ヒットは、Zap70、Lcp2、Lat及びLckなどのTCRシグナル伝達経路の他の既知の成分、並びに細胞接着及びインテグリン関連遺伝子Fermt3、Tln1、Itgav及びItgb3を含んでいた(図2B~2D)。疲弊の上位100陽性制御因子のGO用語分析により、「T細胞受容体シグナル伝達経路」用語は高度に濃縮されていた(padj=7.30×10<sup>-6</sup>;図2E)。驚くべきことに、TCR関連GO用語に加えて、「クロマチン再構成」(padj=1.46×10<sup>-6</sup>)、「クロマチン組織化」(padj=8.92

50

$\times 10^{-4}$  )、及び「ヌクレオソーム分解」(  $padj = 4.02 \times 10^{-5}$  ; 図 2 E )を含む、その他の上位用語はエピジェネティクスに関連していた。追加の上位ヒットの検査により、*Wdr82*、*Actr8*、*Ino80*、*Actb*、*Elmsan1*、*Ino80b*、*Hdac1* 及び *Arid1a* を含むいくつかのクロマチン関連因子が同定された(図 2 F、左)。同時刺激及び抑制性受容体である *Icos*、*Pdcd1*、*Ctla4*、*Cd28*、*Havcr2*、*Lag3* 及び *Tigit* はスクリーンにより著しく濃縮されてはいなかった(図 2 F、中央)。TFs *Irf4*、*Junb*、*Eomes* 及び *Batf3* は枯渇しており、*Tbx21* 及び *Nr4a3* は適度に濃縮されており、疲弊におけるその役割についての以前の証明を支持していた(図 2 F、中央)。これとは対照的に、*Tox* 及び *Tox2* はこのスクリーンでは重大なヒットではなく、これらの因子の欠失は、おそらく活性化誘導細胞死のせいで、インビボでの T 細胞持続性を改善しない可能性があることを示している(図 2 F、中央)。同様に、*Jun* 及び *Batf* はヒットではなく、これらの因子の過剰発現は T 細胞持続性を改善したが、欠失はこれを改善しなかったことを示唆している。他の上位ヒットは、*Pggt1b*、*Spccs3*、*Sec63*、*Eif4g2*、*Sec62* 及び *Fas* などの遺伝子を含んでいた(図 2 F、右)。スクリーンは陰性のヒットを同定しており、これらのヒットは慢性抗原の存在下で持続性のための遺伝子を表し、*Zfp217*、*Gcnt2*、*Usp22*、*Irf4* 及び *Cblb* を含む(図 2 C)。

10

#### 【0181】

サイトスケープを使用して、上位陽性及び陰性ヒットのタンパク質 - タンパク質相互作用ネットワークを視覚化した(図 3)。この分析により、TCR 複合体及び下流シグナル伝達成分、並びにいくつかの他のタンパク質複合体及び機能的カテゴリーと直接会合するヒットの高度に相互接続し濃縮されたネットワークが確認された。これらの複合体は、*Ino80* ヌクレオソーム再構成複合体(ヒットは、*Ino80*、*Ino80b*、*Actr5* 及び *Actr8* を含んでいた)、ヒストンメチル化を調節する *Set1C/COMPASS* 複合体(ヒットは、*Wdr82*、*Dpy30* 及び *Setd1b* を含んでいた)、*SWI/SNF* クロマチン再構成複合体(ヒットは、*Arid1a*、*Smarcb1*、*Smarcd2*、*Smarca4* 及び *Smarrcc1* を含んでいた)、並びに *Hdac1*、*Dnattip1* 及び *Elmsan1* を含む有糸分裂デアセチラーゼ(*MidAC*)複合体を含んでいた。*SWI/SNF* ファミリーメンバー内では、*Smarrcc1*、*Smarcd2* 及び *Smarcb1* は BAF コアの一部であり、このコアは *Arid1a*、*Smarca4* (ATP アーゼ)、*Actb* 及び他の成分と一緒に集合して BAF 複合体を形成する(Mashitali ら、2018 年)。mRNA プロセッシング CSTF 複合体(*Cstf1*、*Cstf2* 及び *Cstf3*)、N6 - メチルアデノシン(m6A)RNA 修飾関連遺伝子(*Zfp217*、*Rbm15* 及び *Virma*)、並びに小胞体及びタンパク質分泌(*Spccs2*、*Spccs3*、*Sec62*、*Sec63*)、脂質生合成(*Gpi1*、*Pigv*、*Dpm3*)、及びミトコンドリア複合体 V(*Atp5b*、*Atp5d*、*Atp5a1*) に関係するいくつかのヒットの濃縮も観察された。

20

30

#### 【0182】

疲弊した T 細胞の以前報告された単一細胞 RNA - seq データでの遺伝子発現パターンを、慢性ウイルス感染において分析した(Raju ら、(2021) J. Immunol. 206 (12) 2924 ~ 2936 頁; 図 8 A ~ 8 B)。このデータセットは、前駆体、一過性、及びターミナル疲弊した T 細胞の重要なサブタイプを包含し、上位 100 の陽性ヒットの分析により、すべての因子が慢性ウイルス感染における T 細胞で検出できるほど発現されることが示された(図 8 C ~ 8 D)。さらに、これらの遺伝子のうちの 2 つ、*Tmem253* 及び *Itgb3* を除くすべてが疲弊中の早期に発現され(上位 100 ヒットのうちの 98 が前駆体疲弊 T 細胞において検出できるほど発現された)、疲弊したサブタイプにわたって比較的安定したままであり、エピジェネティック要因及び他のヒットの破壊が、最終分化後にはじめて疲弊を逆転させるよりはむしろ T 細胞疲弊の分子コースを変更することを示唆していた(図 8 C)。

40

#### 【0183】

50

## [ 実施例 3 ]

インビボ C R I S P R スクリーンは腫瘍での T 細胞持続性を制限するエピジェネティック因子を同定する

2, 000 sgRNA のカスタムプールを作成し、これには上位 300 ヒット ( 遺伝子あたり 6 sgRNA ) を標的にする sgRNA、並びに 100 の非ターゲティング及び 100 の単一ターゲティング対照が含まれていた。sgRNA プールは、異なる T C R 配列に起因する機能的変異性を取り除くために、Cas9 / OT - 1 T 細胞中に導入した。0 日目、卵白アルブミンを異所的に発現した両側性 MC - 38 コロン腺癌腫瘍が Rag1<sup>-/-</sup> マウスに注射され、CD8 + T 細胞が Cas9 / OT - 1 マウスから単離された。1 日目、T 細胞はカスタムミニプールを形質導入された ( 図 4 A )。3 つの異なる T 細胞投与プロトコルを使用して、プロトコル特異的のノックアウト効果をモニターした: グループ 1 は、腫瘍播種の 6 日後マウスあたり  $1 \times 10^6$  の T 細胞を受けた、グループ 2 は、腫瘍播種の 6 日後マウスあたり  $5 \times 10^5$  の T 細胞を受けた、グループ 3 は、腫瘍播種の 9 日後マウスあたり  $5 \times 10^5$  の T 細胞を受けた ( 図 9 A )。腫瘍サイズの T 細胞用量依存性減少が観察された。マウスの腫瘍及び脾臓は 15 日目 ( グループ 1 及び 2 ) 又は 18 日目 ( グループ 3 ) に収穫され、それぞれの組織に存在する sgRNA を配列決定した ( 図 9 A 及び 22 A )。最後に、sgRNA 濃縮を計算し、結果をすべてのマウスから合わせて、対照分布と比べた、それぞれの遺伝子について集約腫瘍 L F C z - スコア及び脾臓 L F C z - スコアを作成した ( 図 4 B 及び 12 A ~ 12 C )。

## 【 0184 】

T C R 複合体及びシグナル伝達遺伝子を標的にする sgRNA を分析した。なぜならば、これらのガイドを含む細胞は抗原を認識する能力が損なわれており、したがって腫瘍中で枯渇するはずだからである。実際、以前同定された T C R 及びインテグリンシグナル伝達関連ヒットのほぼすべてを標的にする sgRNA は、脾臓と比べて腫瘍中では枯渇していた ( 図 4 C )。同様に、いくつかの他の機能的カテゴリーでの遺伝子は腫瘍と脾臓の両方でも枯渇しており、インビボでのこれらのノックアウトの全般的増殖障害をおそらく示している ( 図 12 A 及び 12 D )。

## 【 0185 】

しかし、これとは対照的に、インビトロヒットの選択されたグループは腫瘍でも脾臓でも強力に濃縮されており、大部分がクロマチン関連因子で構成されていた ( 図 4 B ~ 4 C 及び 12 A ~ 12 C )。腫瘍において濃縮された上位ヒットの中には T F s、N r 4 a 3 及び G a t a 3 があった。I n o 8 0 複合体因子である I n o 8 0、A c t r 5 及び A c t r 8、S e t 1 C / C O M P A S S 複合体メンバーである W d r 8 2 及び S e t d 1 b、B A F 複合体メンバーである A r i d 1 a 並びに M i D A C 複合体メンバーである H d a c 1 及び E l m s a n 1 を含む 8 つのエピジェネティック制御因子の機能的役割が同定された ( 図 4 B )。G a t a 3 は、T 細胞疲弊の発生を調節することが以前実証された転写因子であり、重要なことに、この因子が欠失するとインビボでの T 細胞機能、持続性及び腫瘍抑制が改善される。残りのヒットは T 細胞疲弊又は免疫療法文脈では研究されていない。サイトスケープネットワークという文脈でのそれぞれの遺伝子の腫瘍濃縮を視覚化することにより、2 つのクロマチン再構成複合体である、I N O 8 0 複合体 ( サブユニット I n o 8 0 c 及び A c t r 5 ) 及び B A F 複合体 ( サブユニット A r i d 1 a、S m a r c d 2 及び S m a r c c 1 ; 図 12 D ) のサブユニットを含む、インビボでの陽性ヒットの多くがエピジェネティック因子であることが明らかになった。G タンパク質共役型受容体である G p r 137 c、ガングリオシド生合成に関与している酵素である B 4 g a l n t 1、及び I L - 2 誘導性 T 細胞キナーゼである I t k などの他のカテゴリーも表された。上位陽性ヒットの sgRNA 濃縮が計算され、インプット対照と比較した。それぞれの遺伝子ノックダウンは、腫瘍中の T 細胞蓄積を 3 . 4 倍まで改善した。比較すると、C d 3 d を欠く T 細胞は 6 . 7 倍枯渇し、C d 3 e を欠く T 細胞は 3 . 3 倍枯渇し、上位ヒットを標的にすると腫瘍中での T 細胞持続性が実質的に改善されたことを示している ( 図 12 E 及び 22 C )。さらに、それぞれのノックアウトの持続性利点は腫瘍と脾臓におい

10

20

30

40

50

て類似しており、T r p 5 3を除く攪乱で慢性T C R刺激なしで（インビトロでは急性刺激中に）実質的に改善した適性を示したものはなく、全般的なT細胞適性を改善するよりはむしろ慢性抗原刺激という状況においてのみT細胞持続性を改善する攪乱を同定するC R I S P Rスクリーン戦略の特異性を再び実証した（図1 2 E ~ 1 2 F及び2 2 C）。

#### 【0 1 8 6】

インビボでのT細胞機能における以前特徴付けられていないT F、Z f p 2 1 9についての役割も同定された。これらのエピジェネティック因子を標的にするs g R N Aは、N r 4 a 3及びG a t a 3を標的にするs g R N Aよりも腫瘍中で高度に濃縮されていた。サイトスケープネットワークという文脈でのインビボs g R N A z - スコアのG O用語分析及び視覚化により、機能的カテゴリーがクロマチン及びヌクレオソーム再構築及び組織化に関係しており、ヒストン修飾は遺伝子の主に濃縮されたグループであることが確かめられた（図4 E及び9 C ~ 9 D）。腫瘍及び脾臓試料での上位1 5のインビボヒットについてのs g R N A濃縮は別々に、及びT細胞投与プロトコルにわたって分析した。それぞれの遺伝子を標的にするs g R N Aは、個々のマウス、器官及び腫瘍サイズにわたって再現性よく濃縮された（図4 F、4 G、9 B）。注目すべきは、それぞれのエピジェネティック因子の欠失は、対照s g R N Aと比べて、腫瘍中のT細胞蓄積をおおよそ約3 ~ 5倍改善したが、これはC D 3共受容体、C d 3 dの成分を欠くT細胞について観察されたT細胞枯渇のスケールに匹敵しており、これらの遺伝子の欠失により媒介されるT細胞機能の有意な改善を示している（図4 F）。

#### 【0 1 8 7】

##### [ 実施例 4 ]

T I LにおけるT細胞疲弊因子のインビボP e r t u r b - s e q

P e r t u r b - s e qは、単一細胞においてC R I S P R攪乱及びトランスクリプトームを捕獲するが、インビボC R I S P Rスクリーンにより同定されるそれぞれのノックアウトにおいて改善されたT細胞機能を駆動する分子機構を理解するために使用された。具体的には、直接捕獲P e r t u r b - s e qが使用されたのは、それがs g R N Aから離れたバーコード配列を有するベクターを、又は標準s g R N Aベクターへの他の修飾を必要としないからであり、したがって、レトロウイルス試薬と直ちに適合したからであった。s g R N Aの第3のカスタムs g R N Aプール（マイクロプール）は、（1）インビトロアッセイにおいて優先的に持続した、（2）インビボで優先的に増殖し腫瘍に浸潤した、及び（3）クロマチン関連タンパク質又はT Fであった遺伝子に優先順位をつけることにより設計された。これらの基準に基づいて、P e r t u r b - s e q分析用に9つの遺伝子：W d r 8 2、S e t d 1 b、A r i d 1 a、A c t r 8、I n o 8 0、H d a c 1、E l m s a n 1、N r 4 a 3及びZ f p 2 1 9が選択された。s g R N Aプールは、遺伝子あたり2つのガイド、並びに2つの非ターゲティング及び2つの単一ターゲティング対照ガイドを含み、合計で2 2のs g R N Aであった。すべてのガイドの類似する表示を確実にするため、2 0 b p可変s g R N A配列を含むプライマーの対を個々にアニールし、次にこれをプールして、レトロウイルスベクターp M S C V地位と一緒にクローニングした。

#### 【0 1 8 8】

類似のインビボT細胞プロトコルを、もっと大きなC R I S P Rスクリーンについて以前記載された通りに実施し、C D 8 + T細胞をC a s 9 / O T - 1マウスから単離し、それにs g R N Aマイクロプールを形質導入し、次にM C - 3 8卵白アルブミン腫瘍を維持するR a g 1 - / - マウス中に移植した。9日後、腫瘍を収獲し、T I Lを単離し、直接捕獲P e r t u r b - s e qは、1 0 x ゲノム5 ' 遺伝子発現プラットフォームを使用してs g R N Aアイデンティティ及び遺伝子発現プロファイルの情報を同時に読み出すのに使用された（図5 A）。品質管理フィルタリング後、高品質s c R N A - s e qプロファイルは2 , 3 0 5細胞から得られ、s c R N A - s e qクラスター化及び次元縮退は4クラスターを同定した（図5 B）。すべての細胞クラスターが中程度のP d c d 1及びH a v c r 2を発現する細胞を含んでおり、細胞クラスターが腫瘍微小環境において疲弊し

た T 細胞を表すことを示す ( 図 1 0 A )。クラスター 1 とクラスター 2 の間のマーカー遺伝子を比較すると、クラスター 1 のほうが、*T n f r s f 9* ( 4 - 1 B B をコードする ) 及び *T n f r s f 4* ( O X 4 0 をコードする ) を含む共刺激分子、細胞傷害性分子である *G z m b* 及び *P r f 1*、並びに *L a g 3*、*H a v c r 2* 及び *C d 1 6 0* を含む抑制性受容体のより高い発現を有することが明らかになった ( 図 1 0 B )。これとは対照的に、クラスター 2 のほうが、前駆体疲弊遺伝子である *T c f 7*、*I f n g r 1* 及び *C c l 5*、並びに *I f i t 1*、*I f i t 3*、*I r f 1* 及び *I r f 7* を含むいくつかのインターフェロン応答遺伝子のより高い発現を有していた ( 図 1 0 B ~ 1 0 C )。クラスター 1 及びクラスター 2 は、細胞の大多数を含み、クラスター 3 は、より高いパーセンテージのミトコンドリア読取り情報を有する細胞の小集団を含み、クラスター 4 は、*M k i 6 7* 発現を特徴とする少数の増殖細胞を含んでいた ( 図 1 0 A )。

10

#### 【 0 1 8 9 】

高信頼度 *s g R N A* アイデンティティは、細胞カウントマトリックスにより *s g R N A* を検討し生 ( 細胞 ) *z* - スコアを計算することによってそれぞれの細胞について決定した ( 図 5 C 及び 1 0 D )。最大 *s g R N A* *z* - スコア > 3 を有するいかなる細胞も、最大 *z* - スコアを有するガイドを含むと判定され、*s g R N A* カウントのない細胞は「ノーガイド」と指定され、もっと低い最大 *z* - スコアを有する細胞は「マルチガイド」と指定された。所与の攪乱を有する細胞についての平均遺伝子発現プロファイルが計算され、対照細胞の遺伝子発現プロファイルが引き算され、差次的遺伝子発現プロファイルは、異なる攪乱にわたって互いに関係づけられた ( 図 5 D )。全体としては、それぞれの遺伝子 *K O* を有する細胞はその転写プロファイルに大規模な変化を示した ( 1 , 4 7 4 ~ 2 , 5 3 3 誘導された遺伝子 *L F C* > 0 . 1 ; 6 4 3 ~ 2 , 9 0 0 抑制された遺伝子 *L F C* < - 0 . 1 ; 図 1 0 E )。 *E l m s a n 1*、*N r 4 a 3*、*Z f p 2 1 9*、*A r i d 1 a*、又は *S e t d 1 b* が枯渇した細胞は、遺伝子発現の高度に相関関係する変化を見せ ( 攪乱のすべての対について *R* > 0 . 5 )、これらの因子のノックアウトにより誘導される収束表現型を示した ( 図 5 D )。対照細胞と比べたそれぞれの攪乱に対する「誘導された」又は「抑制された」遺伝子のセットが定義され、すべての攪乱が *N r 4 a 3* により誘導された又は抑制された遺伝子のおおよそ半分を共有していた ( 図 1 0 E )。遺伝子セットの重複は 5 つの攪乱 - *Z f p 2 1 9* - *K O*、*N r 4 a 3* - *K O*、*A r i d 1 a* - *K O*、*E l m s a n 1* - *K O* 及び *S e t d 1 b* - *K O* - について視覚化し、重複している遺伝子の最大のグループがすべての攪乱にわたって共有されていることが見出された ( 図 5 E ~ 5 F )。これらの遺伝子は、( 1 ) *T n f*、*I f n g* 及び *I l 7 r* の上方調節並びに *G z m b*、*G z m c* 及び *G z m f* の下方調節を含む、細胞傷害性分子、サイトカイン及びサイトカイン受容体、( 2 ) *B a t f*、*I r f 4* 及び *K l f 2* の上方調節並びに *T b x 2 1* の下方調節を含む、疲弊関連 *T F*、並びに ( 3 ) *S l c 1 a 5* ( *A S C T 2*、輸入グルタミン)、*S l c 3 8 a 1* ( *S N A T 1*、中性アミノ酸) 及び *S l c 3 8 a 2* ( *S N A T 2*、中性アミノ酸) の上方調節を含む、アミノ酸輸送体及び他の代謝遺伝子を含んでいた。抑制性受容体発現の単離された変化が観察されたが、攪乱にわたって一貫した変化は観察されなかった ( 図 5 G )。

20

30

#### 【 0 1 9 0 】

40

#### [ 実施例 5 ]

*T I L* ミニプール *C R I S P R* スクリーンはインビトロでの T 細胞疲弊の遺伝子調節因子を確認する

上位に位置するゲノムワイドスクリーン因子をさらに確認し特徴付けるため、2 , 0 0 0 *s g R N A* のカスタムミニプールは、3 0 0 の上位に位置する遺伝子 ( 遺伝子あたり 6 *s g R N A* )、並びに 1 0 0 の非ターゲティング及び 1 0 0 のシングルターゲティング対照を標的にする *s g R N A* を含んでいたが、作成した。インビトロ刺激スクリーンを繰り返し、急性及び慢性試料、並びにインプット試料は 4 日目に収集した ( 図 2 1 A )。生物学的複製間の高一致が観察され、したがって、複製は合わされて 3 種の比較 ( 1 ) 慢性対急性、( 2 ) 急性対インプット、及び ( 3 ) 慢性対インプットを実施した ( 図 2 1 B ~ 2

50

1 E)。慢性対急性比較は、最初のゲノムワイドスクリーンの確証として役立ち、ゲノムワイドスクリーンにおいて有意な陽性ヒットであったプール中の88遺伝子のうち、52(59.1%)はミニプールで確認された( $FDR < 0.05$ ; 図11B及び21C)。次に、慢性対急性遺伝子濃縮は急性対インプット濃縮と比較され、これは、培養中の急性的に刺激された増殖T細胞におけるそれぞれの遺伝子ノックダウンの適合有利又は不利を測定した(図11C、左及び21E)。2つのヒットである、*Trp53*及び*Brd1*は、両方の比較において濃縮されており、これらの因子の枯渇が急性と慢性刺激条件の両方においてT細胞に全体的増殖有利を分け与えることを示している。これとは対照的に、大半の遺伝子は、インプットと比べて急性刺激において類似する(233/300; 77.7%)又は減少した(64/300; 21.3%)濃縮を示し、T細胞増殖一般よりもむしろ、慢性抗原の存在下でT細胞持続性を特異的に改善し、急性刺激後に増殖能力を維持する*sgRNA*の同定を可能にした(類似した:  $-3.5 < z < 3$ 、減少した  $z < -3.5$ 、改善された;  $z > 3.5$ ; 図11C、左及び21E)。最後に、慢性対急性*sgRNA*濃縮は慢性対インプット濃縮と比較されて、急性刺激に対する比較有利のみよりもむしろ慢性抗原刺激後の全体的持続性有利を有する*sgRNA*を同定した(図11C、右)。要約すると、これらのミニプール実験はゲノムワイドCRISPRスクリーンからのヒットを確認し、慢性抗原刺激という状況でのT細胞持続性を選択的に制限する遺伝子を同定した。

【0191】

[実施例6]

cBAF活性を調整すればT細胞持続性を増強できる

*Arid1a*-*sgRNA*細胞の持続性利点(スクリーン中の上位ヒット)を確認し、これらの細胞がインビボでエフェクター機能を保持するかどうかを判定するため、単一ターゲット対照(CTRL1)*sgRNA*をバイオレット励起蛍光タンパク質(VEX)を発現するレトロウイルスベクター中にクローニングし、一方2つの*Arid1a*-*sgRNA* *sgRNA*(*Arid1a*-1及び*Arid1a*-2)を青色蛍光タンパク質(BFP)での置き換えを除いて同一であるベクター中にクローニングする細胞競合アッセイを使用した。両方の*Arid1a*-ターゲット*sgRNA*の活性は、サンガーシーケンシング及びウェスタンブロットによりDNA及びタンパク質レベルで確かめた(図22D~22F)。細胞にはどちらかのベクターを別々に形質導入し、形質導入細胞を濃縮するためピューロマイシンで選択し、互いに混ぜ合わせた。次に、混合した細胞は、インビトロ慢性刺激アッセイ(図13A)又はインビボMC-38腫瘍モデルに投じた(図13B)。インビトロ及びインビボでは、*Arid1a*-*sgRNA*細胞は、対照細胞と比べて、有意に増強された持続性を示し、プールされたスクリーンの結果を確かめた(図13A~13B; *Arid1a*-1対CTRL1の平均正規化比: インビトロ10日目 = 4.03、 $p = 0.0059$ ; インビボ15日目 = 2.46、 $p = 0.033$ ; *Arid1a*-2対CTRL1の平均正規化比: インビトロ10日目 = 3.79、 $p = 0.012$ ; インビボ15日目 = 2.72、 $p = 0.0088$ ; ウェルチ2試料t-検定)。さらに、*Arid1a*-*sgRNA*細胞は、インビトロでの慢性刺激後も低いレベルのPD-1及びTim3を示した(パーセンテージダブル陽性細胞: 27.7%の*Arid1a*-1平均減少、 $p = 0.00099$ ; 10.6%の*Arid1a*-2平均減少、 $p = 0.038$ ; ウェルチ2試料t-検定; 図13A)。最後に、*Arid1a*-*sgRNA*細胞の観察された増強持続性及び変更された分化軌道がインビボで抗腫瘍応答の改善をもたらすかどうかを評価した。Rag1<sup>-/-</sup>マウスは以前記載された通りにMC-38腫瘍を接種し、6日目にCTRL1レトロウイルス又は*Arid1a*-*sgRNA*レトロウイルスを形質導入した $5 \times 10^5$  Cas9/OT-1 CD8<sup>+</sup>T細胞を移植し、腫瘍成長をモニターした(図13C)。15日までに、*Arid1a*-*sgRNA*細胞の移入により、対照細胞の移入と比べて腫瘍クリアランスが有意に改善された(*Arid1a*-*sgRNA*対CTRL1腫瘍サイズ、15日目:  $p = 5 \times 10^{-8}$ 、ウェルチ2試料t-検定)。重要なことに、*Arid1a*-*sgRNA* T細胞を受けたマウスの生存は、CTRL1

T細胞を受けたマウスと比べて有意に延ばされた（生存期間中央値 = 12日（移植なし）、15日（CTRL1）、25日（Arid1a-sgRNA）；Arid1a-sgRNA対CTRL1： $p = 1.20 \times 10^{-8}$ 、図13C）。

#### 【0192】

T細胞疲弊でのBAF複合因子の役割についてのもっと深い推定機構を提供するため、B16及びMC-38腫瘍モデルにおいて29のSWI/SNF複合体サブユニット遺伝子のそれぞれを標的にする追加のCRISPRミニプールスクリーンを設計し、これらの結果は、SWI/SNF複合体集合の構造的文脈において解釈された。前のインビボスクリーンにおいて観察されたように、3つの最も重大なヒットはcBAF複合体にあり（Arid1a、Smrcc1及びSmrcc2）、とりわけ、複合体の他の形態でパラログにより置き換えることができる複合体の位置にあった（図13E~13F）。これとは対照的に、BAFコアの取り換え不能なサブユニット（例えば、Smrce1、Smrccb1）又はATPアーゼモジュール成分の攪乱は有害であり、これらのsgRNAの枯渇をもたらした。したがって、クロマチン上のcBAFの存在を調整（減少）すればT細胞持続性に有益であるモデルが提唱されている。前の機械論的研究により、ARID1A欠損腫瘍がクロマチン上でcBAF複合体の減少した（しかし切除はされない）レベルを示すことが実証され、このせいで重要な転写因子（AP-1因子を含む）の接近が減少した。cBAFに加えて、PBAF複合体メンバーであるArid2を標的にするsgRNAの正の濃縮、及びncBAF複合体メンバーであるBicra1、Bicra及びBrd9を標的にするsgRNAの強い枯渇も観察された（図13E~13F）。要約すると、これらの結果は、Arid1aを含むcBAF複合体サブユニット遺伝子の攪乱がインビボでT細胞持続性及び抗腫瘍免疫を改善できることを実証している。

10

20

#### 【0193】

##### [実施例7]

ARID1Aの攪乱は一次ヒトT細胞においてT細胞持続性を改善する

ヒトT細胞を使用してインビトロ慢性刺激アッセイを再現するため（図14A）、ARID1A（2つの独立したsgRNA）を標的にするCRISPR-Cas9/sgRNA RNP又は対照RNPを一次ヒトT細胞に導入した。細胞は急性培養物と慢性培養物に分けられ、慢性条件は抗CD3被覆プレートを用いて6日間刺激した（マウスアッセイに類似する）。急性刺激培養物では、増殖又は生存能についての表現型間に違いは観察されなかった。しかし、慢性刺激培養物では、ARID1A-sgRNA細胞はCTRL T細胞よりも有意に多く増殖し、より高い生存能を維持した（ARID1A-sgRNA対CTRL1細胞：22.75%生存能の平均増加、 $p = 1.70 \times 10^{-5}$ 、及び5.25倍の拡大増殖の平均増加、 $p = 0.013$ ；図14A）。

30

#### 【0194】

インビボでの及びヒトT細胞機能的CRISPRスクリーンから最近現れた他の遺伝因子という文脈におけるARID1A-sgRNA T細胞の持続性有利を検証するため、インビボヒトT細胞実験用にCRISPRミニプールを設計し、このプールは20の遺伝子を標的にする48のsgRNAを包含し、8つの負の対照ガイドを含んでいた。ARID1A、並びに抑制性受容体であるPDCD1、LAG3及びHAVCR2を標的にするsgRNA、並びにTMEM222、CBLB、TCREB2及びSOCS1などの前のスクリーン由来の他の上位に位置する遺伝子が含まれていた。スクリーンはA375ヒトメラノーマ異種移植片モデルで実施され、このモデルは1G4 TCRを用いて標的にできるNY-ESO-1抗原を発現する。同族1G4 TCRは1日目に2人の独立したドナー由来の一次ヒトT細胞中にsgRNAと一緒に導入され、14日目にNOD-SCID-IL2R $^{-/-}$ ヌル（NSG）腫瘍担持マウス中にT細胞を移植した（図14B）。7日後、T細胞は腫瘍及び脾臓から分別され、それぞれの器官に存在するsgRNAを配列決定し、移植前にその量をインプット試料と比較した。対照sgRNA又は抑制性受容体を標的にするsgRNAの濃縮は観察されず、CD3Dを標的にするsgRNAの枯渇が観察された（図14C~14D）。これとは対照的に、マウスT細胞での結果と一致して、

40

50

A R I D 1 A を標的にする s g R N A は、両方のドナーにおいてインプット試料と比べて腫瘍中で有意に濃縮されており、T 細胞持続性を制限する c B A F の機能がヒト T 細胞でも保存されていることを実証していた（腫瘍中で濃縮していた 8 つの A R I D 1 A - s g R N A 複製対インプットのうちの 7 つが 2 つの独立した s g R N A にわたって出現した；ウィルコクソン検定により A R I D 1 A - s g R N A 対 C T R L L F C  $p = 0.0010$ 、図 14 C ~ 14 D）。

【0195】

[ 実施例 8 ]

T I L におけるクロマチン再構成複合体の転写効果

インビトロ及びインビボ C R I S P R スクリーンにより同定されたヒットでの改善された T 細胞機能を駆動する分子機構を理解するため、単一細胞において C R I S P R s g R N A とトランスクリプトームを同時に捕獲する P e r t u r b - s e q を実施した。I N O 8 0 及び B A F 複合体を標的にする第 3 のカスタム s g R N A プール（マイクロプール）を設計した。両方の複合体は、発生の多くの局面で必要不可欠である A T P 依存性クロマチンリモデラーである。S W I / S N F 遺伝子では、A r i d 1 a、S m a r c c 1 及び S m a r c d 2（インビトロ及びインビボで同定された上位ヒット）、並びに A r i d 2 及び A r i d 1 b、この 2 つは S W I / S N F 特異的ミニプールスクリーンで濃縮されていた、が標的にされた。これらのうち、S m a r c c 1 及び S m a r c d 2 は B A F コア中にあり、A r i d 1 a 及び A r i d 1 b は c B A F 複合体中にあり、A r i d 2 は P B A F 複合体中のみに存在している。I N O 8 0 複合体からは、インビトロとインビボスクリーンの両方で濃縮されていた、A c t r 5 及び I n o 8 0 c が選択された。興味深いことに、A c t r 5 及び I n o 8 0 c の酵母相同体である A r p 5 及び I e s 6 は、互いに物理的に会合して、I N O 8 0 複合体の残りからは独立しているサブ複合体を形成することが明らかにされた。サブ複合体は I N O 8 0 複合体の残りの活性を調節することができ；特に代謝関係の遺伝子で、クロマチンと I N O 8 0 依存的に相互作用し、ヌクレオソーム（特に + 1 ヌクレオソーム）を再位置付けして遺伝子転写を活性化する。最後に、正の対照である P d c d 1 及び G a t a 3、並びに 12 の単一ターゲティング負の対照が含まれており、全部で 9 つの遺伝子を標的にする 48 の s g R N A であった。類似のインビボ T 細胞プロトコルを、より大きな C R I S P R スクリーンについて上記に記載の通りに実施し、C D 8<sup>+</sup> T 細胞を C a s 9 / O T - 1 マウスから単離し、s g R N A マイクロプールを形質導入し、M C - 38 卵白アルブミン腫瘍を担持する R a g 1<sup>-/-</sup> マウス中に移植した。前のスクリーンと同じように、インプット試料（移植の日に収集した）も収集してそれぞれの s g R N A の持続性表現型を評価した。T 細胞移植の 9 日後、腫瘍は収穫された腫瘍であり、T I L を単離し、直接捕獲 P e r t u r b - s e q を使用して、10 × ゲノム 5' 遺伝子発現プラットフォームを使用して s g R N A アイデンティティ及び遺伝子発現プロファイルの情報を同時に読み出した（図 15 A）。2 つの独立した実験にわたる 7 つの生物学的複製 P e r t u r b - s e q 試料由来の細胞を配列決定した（図 23 ~ 23 B）。

【0196】

品質管理フィルタリング後、高品質 s c R N A - s e q プロファイルが 70,646 細胞から得られ、s c R N A - s e q クラスター化及び次元縮退は 6 つのクラスターを同定した（図 15 B）。高信頼度 s g R N A アイデンティティは、同じ細胞で検出された他の s g R N A と比べて、それぞれの s g R N A の濃縮を定量化する z - スコアを使用することによりそれぞれの細胞について同定した。細胞は、その s g R N A が少なくとも 5 の z - スコア、及びその次の最も関連のある s g R N A よりも少なくとも 2 ユニット高い z - スコアを有した場合には特定の s g R N A に割り当てられた。この戦略を用いて、レトロウイルス感染ダブレット、単一細胞捕獲ダブレット、及び / 又はバックグラウンドリードのせいで複数の濃縮された s g R N A を有する細胞はさらなる分析から取り除かれ、52,607 細胞は単一 s g R N A に確信的に割り当てられた（74.4%；図 15 C）。細胞型クラスターは、様々なレベルの抑制性受容体、エフェクターサイトカイン及び重要

な転写因子を発現し、このクラスターは、TMEにおいて疲弊した及びエフェクターT細胞の混合物を表していることを示した(図15D及び23C~23D)。クラスター1細胞は高レベルのKlf2及びSlpr1を発現し(Tエフェクターメモリー; TEM)、クラスター2はMx1を含む高レベルのインターフェロン刺激遺伝子(ISG)を発現し(TISG)、クラスター3は高レベルのTnfrsf9(41BBをコードする)及びCd160(T-41BB)を発現し、クラスター4はPdcd1、Tcf7及びSlamf6を含む高レベルの前駆体疲弊遺伝子を発現し(TEXProg)、クラスター5は最も高いレベルの抑制性受容体Pdcd1、Lag3及びHavcr2を発現し(TEXTerm)、クラスター6は、Mki67を特徴とし細胞周期分析により確かめられるサイクリング細胞から主になっていた(T-サイクリング; 図23C~23D)。クラスターアイデンティティをさらに定義するため、遺伝子シグネチャーは、インビボで急性又は慢性LCMV感染に存在するCD8<sup>+</sup>T細胞型から作成された(図23E~23F)。上位100のマーカー遺伝子は、これらのシグネチャー遺伝子セットの平均発現に従って、我々のPerturb-seqデータセットにおいてそれぞれの単一細胞をスコア化するためにそれぞれのLCMV T細胞クラスターについて使用された。それぞれのクラスターにおいてこれらのLCMVシグネチャーの濃縮を視覚化により、参照データセット中の細胞型に対するいくつかのクラスターの転写類似性が示された(図15E)。例えば、クラスター1はエフェクターメモリー関連遺伝子について濃縮されており(TEMシグネチャー)、クラスター2はTEMISGシグネチャーに類似しており、前駆体及びターミナル疲弊したクラスター(クラスター4及び5)は対応するLCMVシグネチャーを濃縮した(図15E)。

10

20

#### 【0197】

いくつかのsgRNAレベル品質管理は、独立したsgRNAの効果の再現性を評価するために実施した(図15F~15G)。遺伝子発現差はそれぞれのsgRNAとデータセット中の他のすべての細胞の間で計算し、同じ遺伝子を標的にする独立したsgRNAが、異なる遺伝子を標的にするsgRNAの対と比べて高度に相関関係する遺伝子発現変化を有することが確かめられ、後者は、予想通り、ゼロを中心としていた(図15F、上)。同じ複合体を標的にするsgRNAの対の相関関係性を評価し、cBAF遺伝子(Arid1a、Arid1b、Smarrcc1及びSmarrcd2)を標的にするガイドとINO80遺伝子(Ino80c又はActr5)を標的にするガイドを一つにグループ化した。際立ったことに、これらのsgRNA対もガイドのすべての対よりも有意に相関関係しており、同じ複体内の異なるサブユニットを標的にする一般的転写効果を示していた(図15F、下)。sgRNAのすべての対の遺伝子発現相関関係は一緒に視覚化された(図15G)。不偏のクラスター化はsgRNAを相関関係するグループに組織化し、主に標的遺伝子及び標的複合体アイデンティティにより主に駆動された。興味深いことに、Arid2はBAF標的化sgRNAの残りから別々にクラスター化し、cBAFとPBAF複合体に対する異なる役割を示唆している(図15G)。それぞれのsgRNAのインプット表示を、それぞれのsgRNAで検出された細胞の数と一緒に使用して、それぞれのsgRNAと単一ターゲティング負の対照のセットとの間のT細胞蓄積有利を評価した(図15G)。この分析により、インビボスクリーン結果と一致して、sgRNAの大多数が、対照sgRNAと比べて、腫瘍中でT細胞蓄積を増強することが示された。特に、Arid1a-sgRNA細胞は対照と比べて平均で2.74倍濃縮され、Pdcd1-sgRNA細胞は対照と比べて平均で2.67倍濃縮された(図15G)。最後に、それぞれのsgRNAを含む細胞の細胞型クラスター組成を調べた(図15G、右端)。とりわけ、すべての攪乱が、それぞれのクラスター由来の細胞を類似する割合で含んでおり、それぞれの標的遺伝子の枯渇は、細胞型組成又は軌道のホールスケール変化に影響を及ぼすことはないが、むしろ1つ以上のクラスターで遺伝子発現を調節する可能性があることが示唆される。

30

40

#### 【0198】

この可能性をさらに調べるため、同じ遺伝子を標的にするsgRNAを含む細胞を集合

50

させ、差次的遺伝子発現をそれぞれの攪乱について計算し、CTRL 1細胞と比較した(図16A)。cBAFサブユニットであるArid1a、Smardc2又はSmardc1を標的にすると、エフェクター分子であるGzmb及びIfng、細胞表面受容体であるCcr6及びIl7r、並びに転写因子であるIrf4及びBatfの上方調節を含む、T細胞の転写プログラムの共有された全体的変化が誘導された。一方、Pdcd1、Lag3及びCcl5は、cBAF攪乱により一貫して下方調節されていた(図16A)。これとは対照的に、Arid2攪乱は、Pdcd1及びLag3の下方調節を含む、一部の類似点にもかかわらず、異なる遺伝子発現プログラムを誘導した。Gata3及びPdcd1の攪乱は、cBAF又はArid2攪乱から異なる遺伝子発現変化を誘導し、例えば、Pdcd1枯渇後の最も上方調節された遺伝子はToxであり、おそらく、ターミナル疲弊への分化を加速することに対するPD-1欠失の提唱された影響と一致していた(図16A)。それぞれの攪乱により誘導される遺伝子発現変化の集合的類似性を定量化するため、攪乱のすべての対を互いに関連付け、クラスター化は、このメートル法に従って類似していた攪乱をグループ化するように実施した(図16B)。この分析は、cBAF攪乱であるArid1a、Smardc1及びSmardc2が類似するプログラムを誘導し、INO80攪乱であるIno80c及びActr5も高度に相関関係する変化(cBAF攪乱により誘導された変化とは異なっている)を示したという所見を定量的に確かめた。これとは対照的に、Pdcd1及びGata3攪乱は別々にクラスター化したが、互いに中程度の相関関係であった。最後に、遺伝子発現変化がそれぞれのクラスター内での攪乱された細胞対CTRL 1細胞について検討された場合、それぞれの攪乱は、T細胞サブタイプとは無関係に遺伝子発現の高度に一致する変化を誘導した(図23G)。

10

20

#### 【0199】

攪乱された細胞とCTRL 1細胞の間で有意に差別的なすべての遺伝子は集合され、cBAF及びINO80複合体の枯渇により攪乱されたコア遺伝子プログラムが定義された(図16C~16E)。上方調節された及び下方調節された遺伝子セットはそれぞれの複体内で高度に保存されており(図16D~16F及び24A)、cBAF攪乱はBatf、Irf4、Il7r及びCcr2などの遺伝子を誘導し、Stat3、Nfkb1、Nr4a3及びEomesなどの遺伝子を抑制した。これとは対照的に、INO80攪乱は代謝関連遺伝子を実質的に調節した(図16E)。慢性LCMV感染において同定されたカノニカルT細胞状態上へのcBAF枯渇により上方調節された遺伝子の投影により、エフェクターT細胞遺伝子の濃縮が示され、下方調節された遺伝子の投影により、ターミナル疲弊関連遺伝子の濃縮が示された(図16G及び24B)。上方調節遺伝子セットのGO用語分析を実施した。cBAF欠損T細胞で上方調節された遺伝子は、T細胞活性化、細胞接着、サイトカイン産生及びT細胞増殖を含むエフェクター用語を濃縮し、INO80欠損T細胞で上方調節された遺伝子は、酸化的リン酸化及び好気性呼吸を含む、代謝用語を濃縮した(図16H)。これとは対照的に、Pdcd1の攪乱は細胞シグナル伝達関連用語を誘導した(図16H)。これらのデータにより、cBAFとINO80クロマチン再構成複合体のサブユニットは、T細胞疲弊において同じ複体内に大部分保存されている異なる役割を有し、cBAFはエフェクター-及び疲弊関連遺伝子を主に調節し、INO80は代謝を調節することが示された。さらに、クロマチン再構成因子を標的にする転写的影響は、以前知られていた標的であるPdcd1及びGata3の影響と最小限で重複しており、T細胞機能を改善する複数の経路を相乗的に標的にする潜在能力を示唆している(図16F及び24A)。

30

40

#### 【0200】

##### [実施例9]

Arid1a攪乱を用いたターミナル疲弊関連クロマチン到達性

上記の通りに競合アッセイを実施し、CTRL 1とArid1a-sgRNA細胞を規定された比で混ぜ合わせ、インビトロ疲弊を受けさせた。Arid1aを標的にする2つの独立したsgRNAは2通りに使用し、全部で4複製試料であった。6日目と10日目に、CTRL 1とArid1a-sgRNA細胞を同じ培養物から単離し、ATAC-s

50

e q はそれぞれの集団で実施した。最初のアッセイ特徴付けという文脈でこれらの結果を分析するため（図 1）、ナイーブ（0 日目）及び活性化された（2 日目）WT T 細胞のプロファイルが含まれた（図 17 A）。CTRL 1 細胞でのクロマチン状態進行は非攪乱細胞において以前観察された状態まで同様に進んだ。しかし、Arid1a-sgRNA 細胞は異なるクロマチン状態軌道を進み、両方の時点でCTRL 1 細胞よりもナイーブで活性化された試料に近いままであった（図 17 A）。

#### 【0201】

調節エレメントは、6 日目と比べて10 日目のほうが増加した到達性が観察された場合は「開放」ピークと定義され、6 日目と比べて10 日目のほうが減少した到達性が観察された場合は「閉鎖」ピークと定義された（ $p_{adj} < 0.05$ 、 $\log_2 FC > 1$ ）。これらのピークセットの分析により、CTRL 1 T 細胞と比べてArid1a-sgRNA T 細胞において実質的に異なるクロマチン再構成変化が示された（図 17 B ~ 17 C）。第 1 に、Arid1a-sgRNA 細胞は開放ピークの数に顕著に全体的な減少を示し、おそらく、cBAF 枯渇細胞が到達可能なクロマチンを確立することが比較的できないことを表していた（Arid1a-sgRNA: 1, 419 ピーク、CTRL 1: 5, 692 ピーク；図 17 B）。第 2 に、Arid1a-sgRNA 細胞とCTRL 1 細胞はクロマチンを類似する程度に閉じたが、大多数のこれらの領域は非重複であった（Arid1a-sgRNA: 5, 126 ピーク、CTRL 1: 4, 558 ピーク；図 17 B）。Pdcd1、Lag3、Entpd1 及びIfng 遺伝子座を取り囲む調節エレメントを含む、個々の疲弊関連調節エレメントを調べると、CTRL 1 細胞と比べて、Arid1a-sgRNA 細胞での到達性の実質的な喪失が明らかにされた（図 17 D）。ターミナルTEX 特異的ピークセット（図 1 に定義されている）の分析により、これらの部位が、両方の時点でCTRL 1 細胞でよりもArid1a-sgRNA 細胞でのほうが有意に到達性が少ないことが示された（CTRL 1 細胞と比べたArid1a-sgRNAでのターミナルTEX ピークの到達性の平均減少：6 日目 41.7%（ $p < 2.2 \times 10^{-16}$ 、ウィルコクソン検定）及び10 日目 40.8%（ $p < 2.2 \times 10^{-16}$ 、ウィルコクソン検定）；図 17 E 及び 24 C ~ 24 D）。TF 結合部位でのクロマチン到達性は、chromVAR を使用して分析し、これによりFos、Jun 及びAP-1 モチーフを含むターミナル疲弊関連TF モチーフが、CTRL 1 細胞と比べて、Arid1a-sgRNA 細胞でのほうが到達性が有意に少ないことが示された（図 17 F）。反対に、Ets、Klf 及びIrf モチーフを含む、エフェクターT 細胞機能に関連するいくつかのTF モチーフは、Arid1a-sgRNA 細胞で増加した到達性を示した。最後に、慢性刺激されたARID1A-sgRNA ヒトT 細胞のATAC-seq 分析により、対照T 細胞と比べて、AP-1 モチーフでの全体的クロマチン到達性の類似する喪失が示され、ヒトT 細胞におけるARID1A の保存されたエピジェネティック機能を支持していた（図 24 E ~ 24 G）。これらの結果は、Arid1aを含む、cBAF サブユニットの枯渇が、クロマチンへのAP-1 TF の接近を制限し、それによって、ターミナル疲弊関連クロマチン状態の獲得を予防することによりT 細胞機能を改善する可能性があることを示唆していた。

#### 【0202】

本明細書で引用される出版物、特許出願及び特許を含むすべての参考文献は、あたかもそれぞれの参考文献が、参照により組み込まれることが個々に具体的に指示されており、その全体が本明細書に明記されている場合と同じ程度に参照によりここに組み込む。

#### 【0203】

本発明を実行するために本発明者らに知られている最良の様式を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載されている。それらの好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読めば当業者には明らかになる可能性がある。本発明者らは当業者がそのような変形を必要に応じて用いると予想しており、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載される以外の方法で実行されることを意図している。したがって、本発明は、適用法令により許可されるここに添付される特許請求の範囲に列挙される主題の改変物及び等価物す

べてを含む。さらに、上記の要素のその考えられるあらゆる変動でのいかなる組合せも、本明細書に別段指示されなければ又は別段文脈と明白に矛盾しなければ本発明に包含される。

【図面】  
【図 1 A】

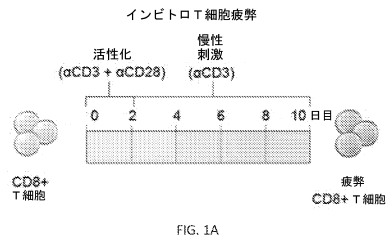


FIG. 1A

【図 1 B】

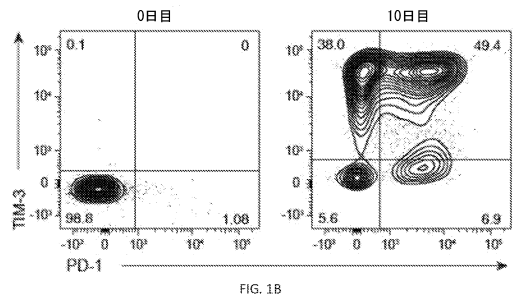


FIG. 1B

【図 1 C】

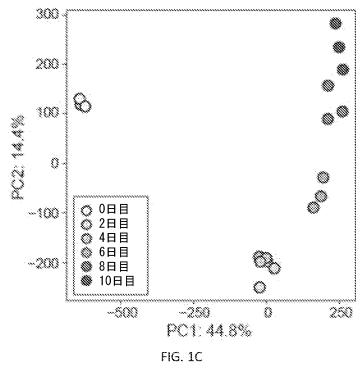


FIG. 1C

【図 1 D】

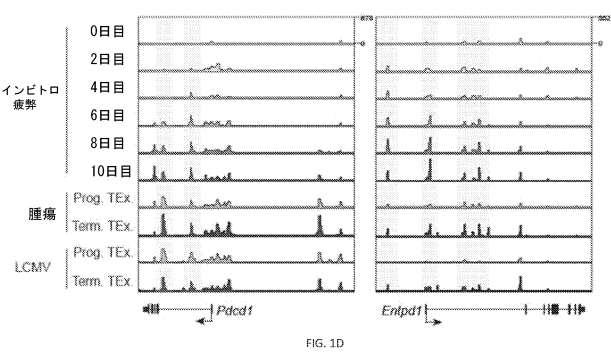


FIG. 1D

10

20

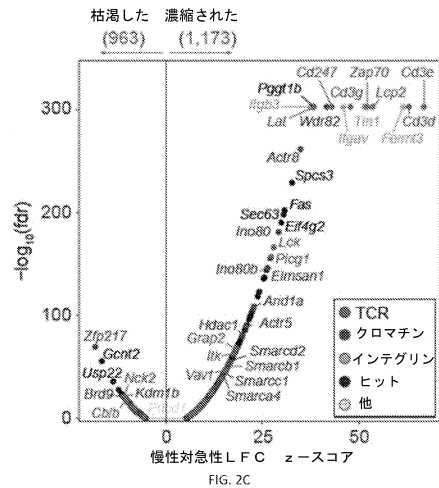
30

40

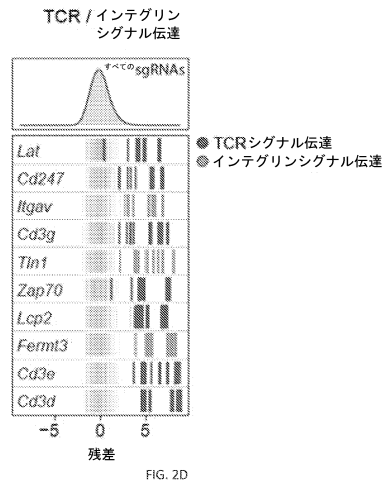
50



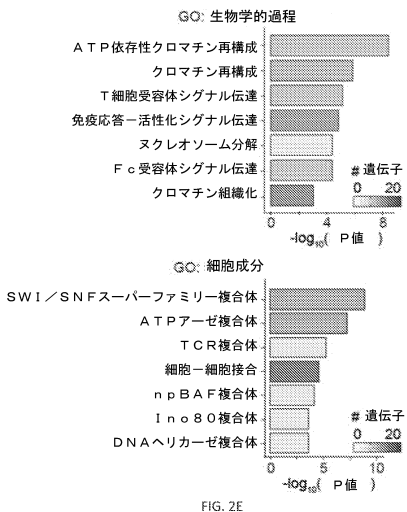
【図 2 C】



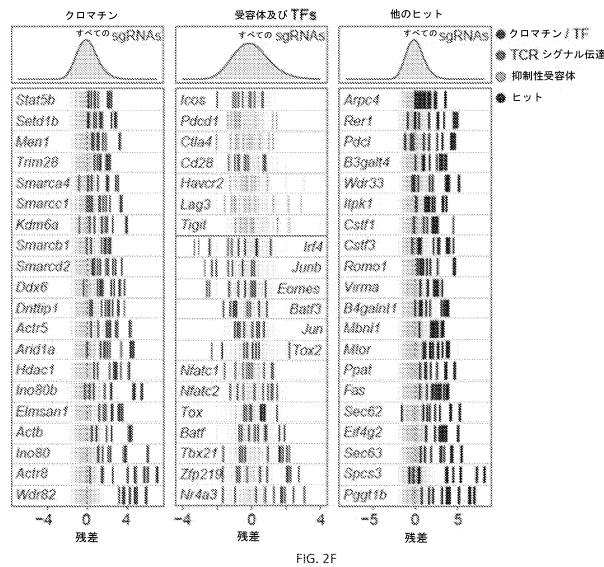
【図 2 D】



【図 2 E】



【図 2 F】



10

20

30

40

50

【図 3】

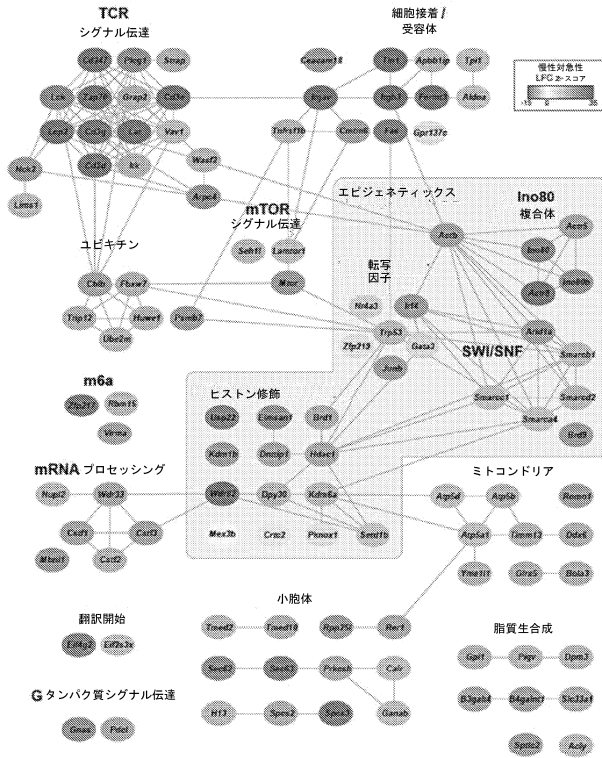


FIG. 3

【図 4 A】

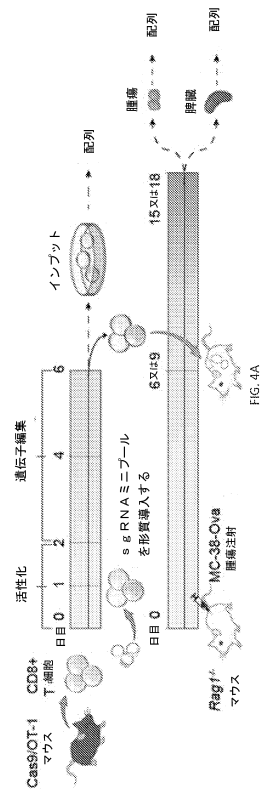


FIG. 4A

【図 4 B】

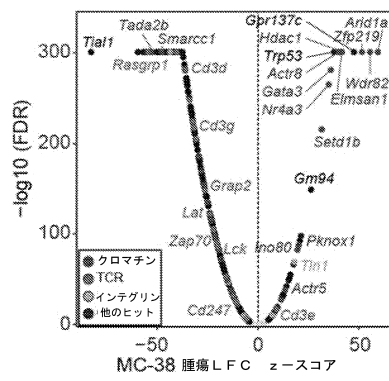


FIG. 4B

【図 4 C】

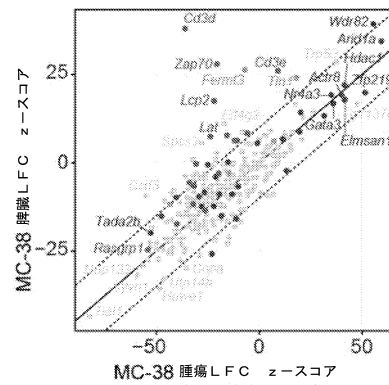


FIG. 4C

10

20

30

40

50

【図 4 D】

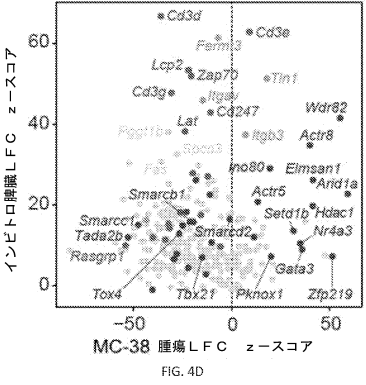


FIG. 4D

【図 4 E】

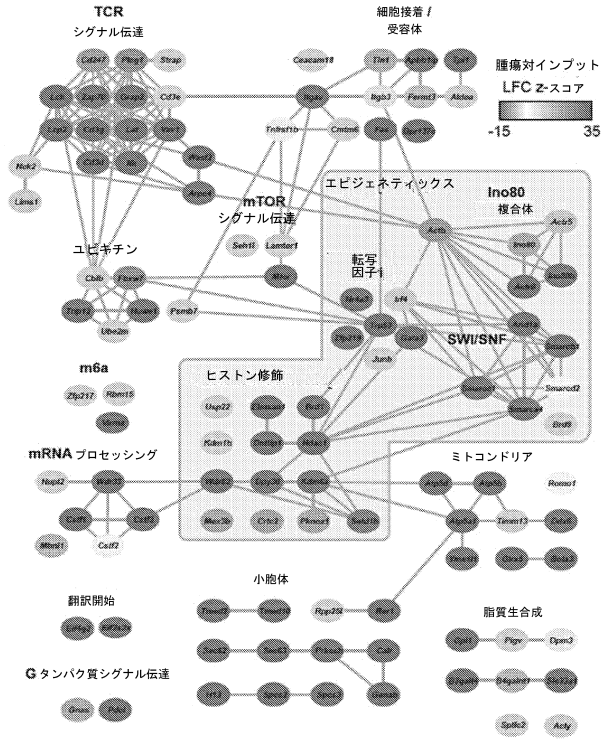


FIG. 4E

【図 4 F】

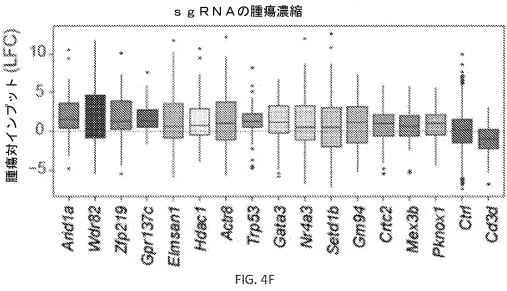


FIG. 4F

【図 4 G】

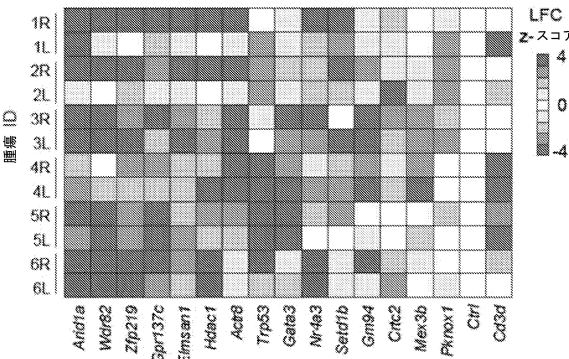
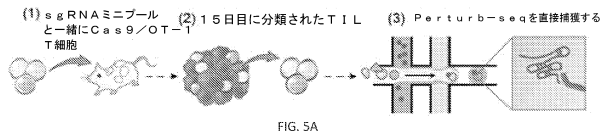
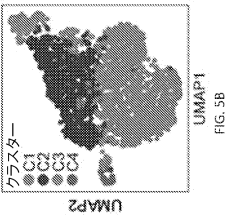


FIG. 4G

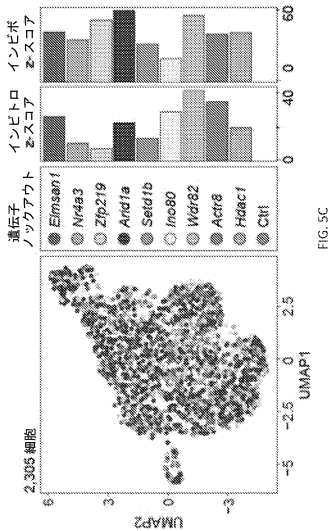
【図 5 A】



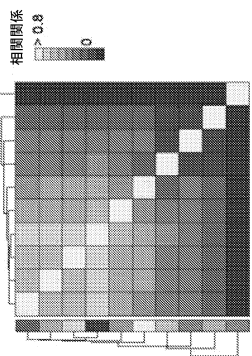
【図 5 B】



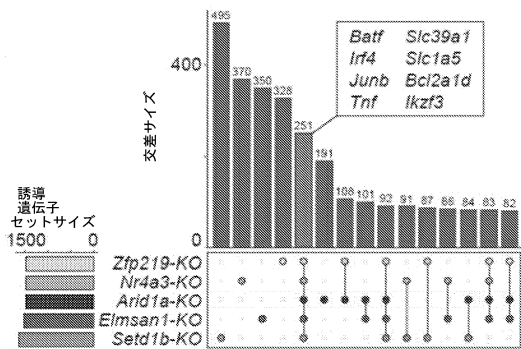
【図 5 C】



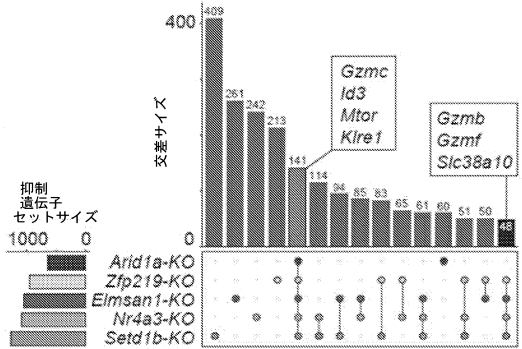
【図 5 D】



【図 5 E】



【図 5 F】



10

20

30

40

50

【 図 5 G 】

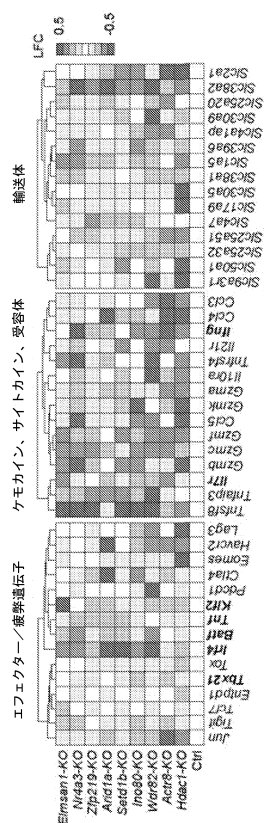


FIG. 5G

【 図 6 A 】

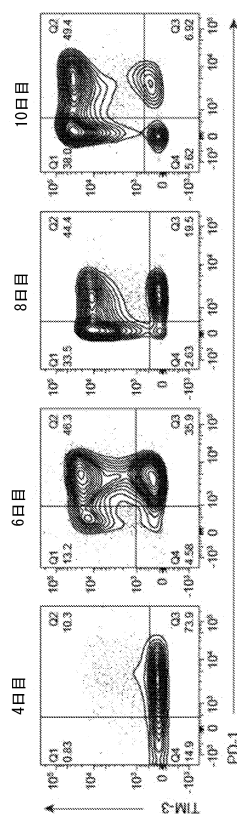


FIG. 6A

10

20

【 図 6 B 】

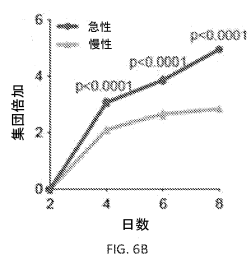


FIG. 6B

【 図 6 C 】

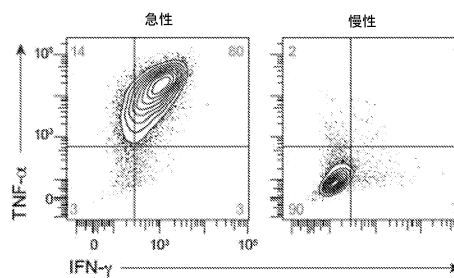


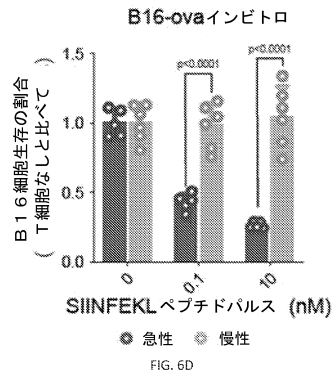
FIG. 6C

30

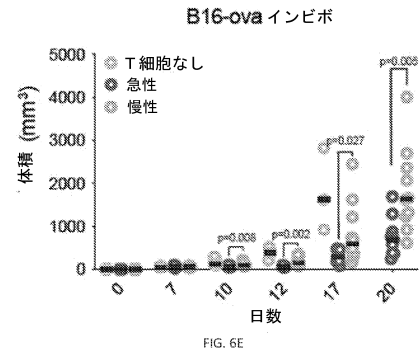
40

50

【 図 6 D 】

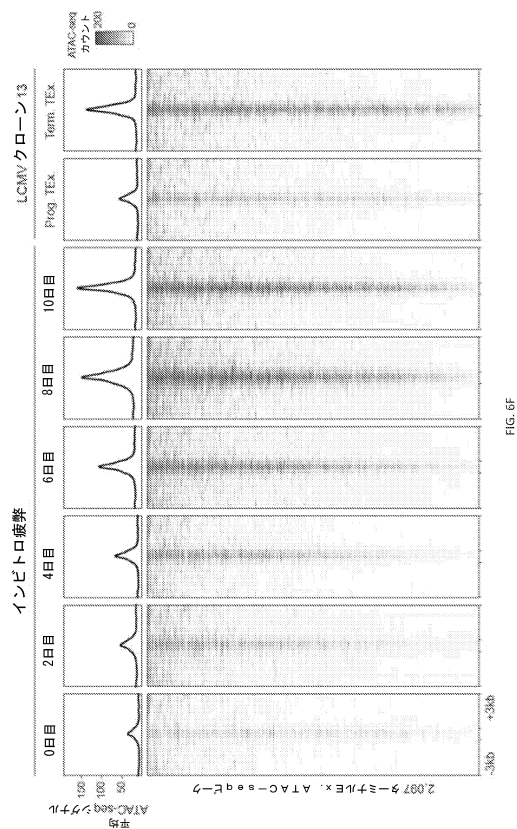


【 図 6 E 】

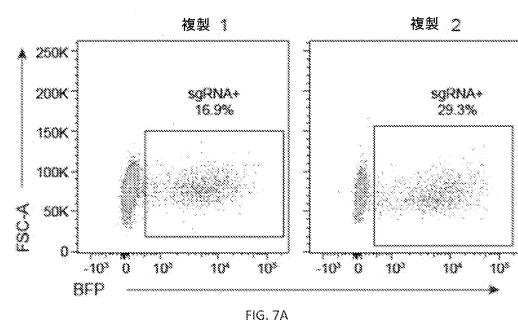


10

【 図 6 F 】



【 図 7 A 】



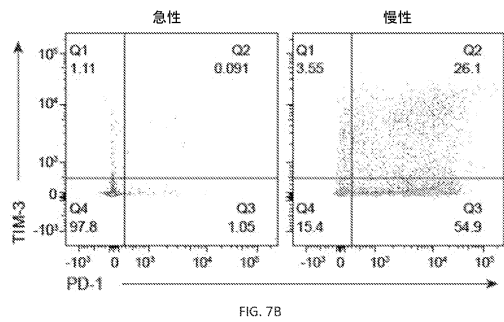
20

30

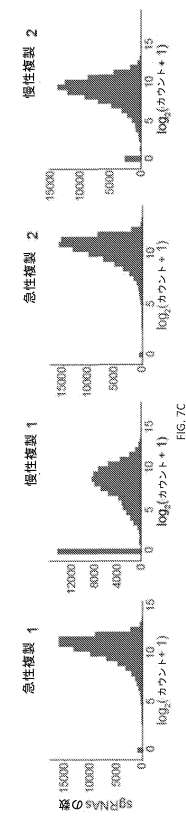
40

50

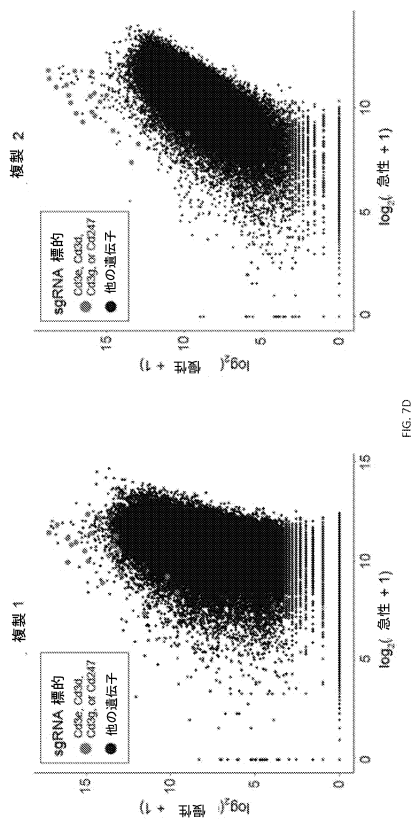
【 図 7 B 】



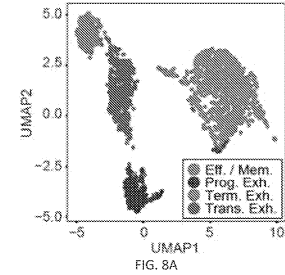
【 図 7 C 】



【 図 7 D 】



【 図 8 A 】



10

20

30

40

50

【図 8 B】

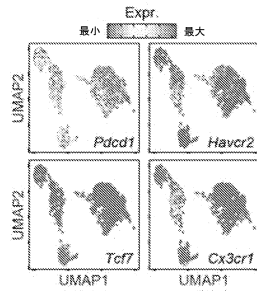


FIG. 8B

【図 8 C】

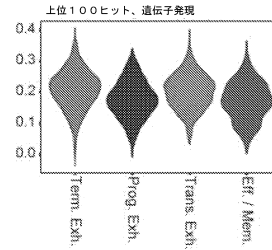


FIG. 8C

10

【図 8 D】

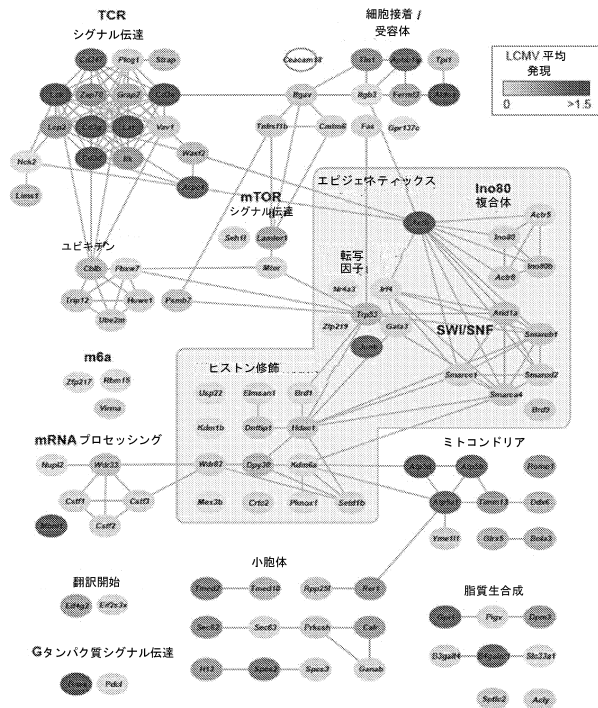


FIG. 8D

【図 9 A】

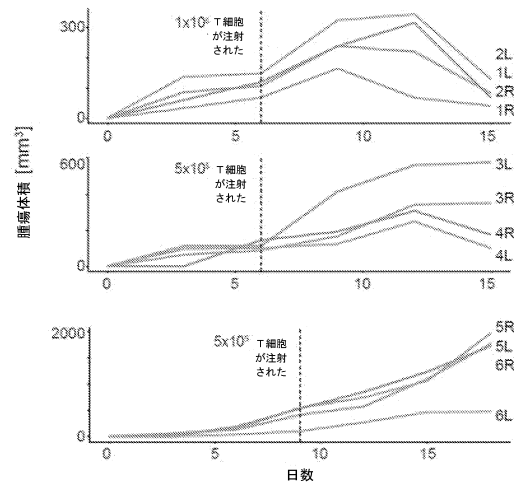


FIG. 9A

20

30

40

50

【図 9 B】

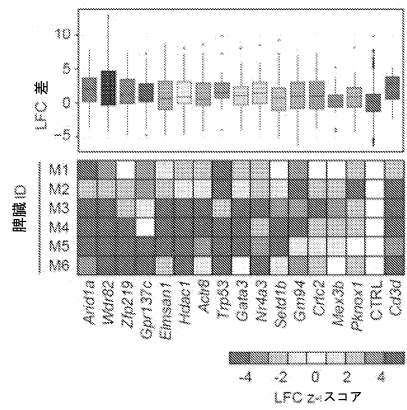


FIG. 9B

【図 9 C】

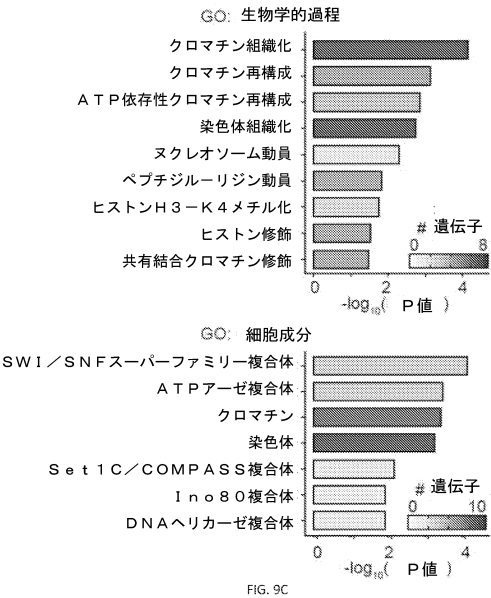


FIG. 9C

【図 9 D】

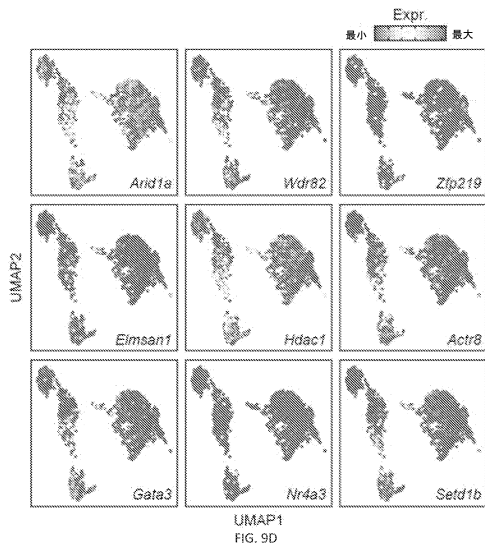


FIG. 9D

【図 10 A】

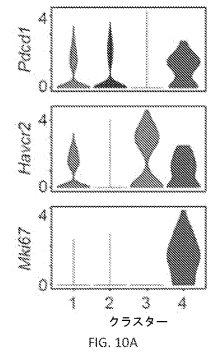


FIG. 10A

10

20

30

40

50

【 図 1 0 B 】

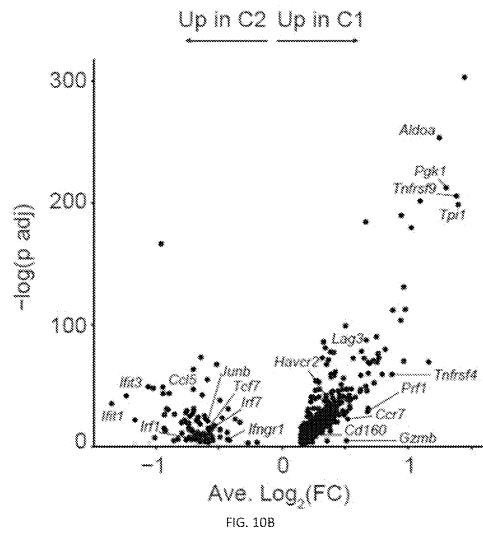


FIG. 10B

【 図 1 0 C 】

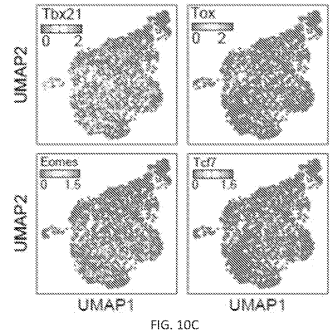


FIG. 10C

10

【 図 1 0 D 】

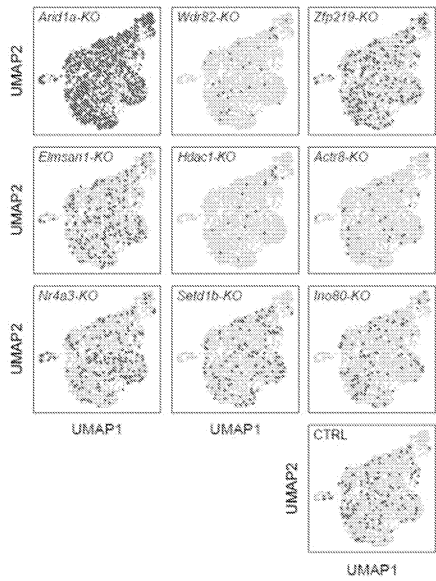


FIG. 10D

【 図 1 0 E 】

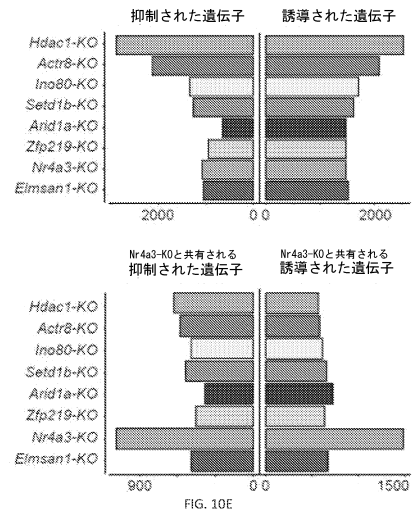


FIG. 10E

20

30

40

50

【図 1 1 A】

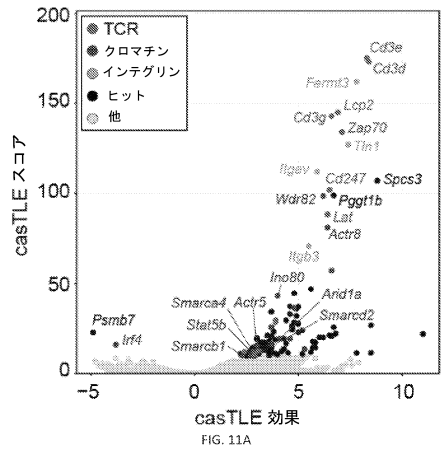


FIG. 11A

【図 1 1 B】

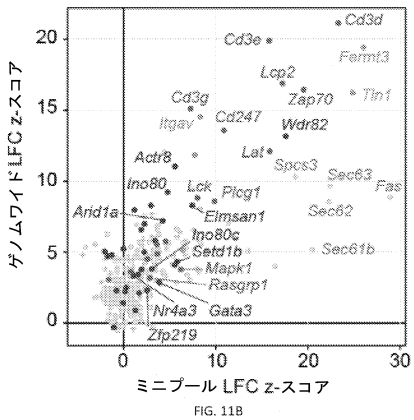


FIG. 11B

【図 1 1 C】

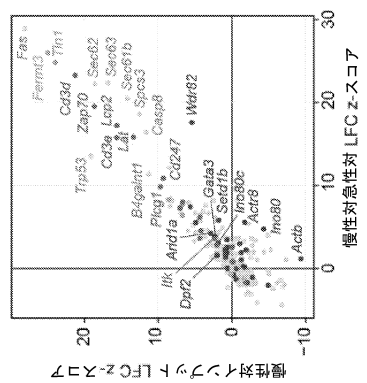


FIG. 11C

【図 1 2 A】

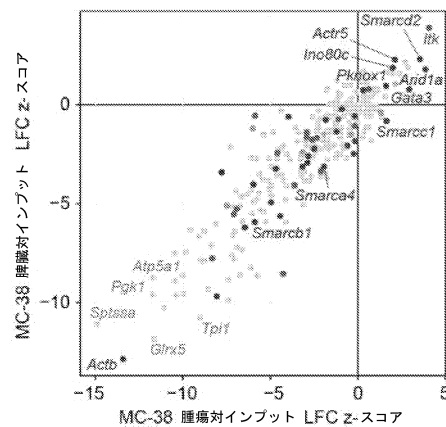
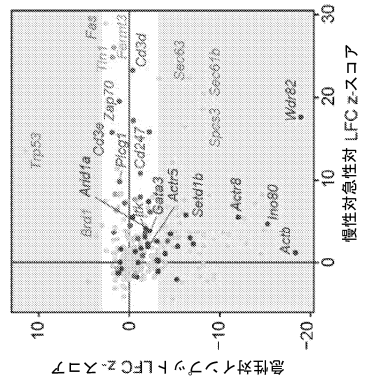


FIG. 12A



10

20

30

40

50

【図 12 B】

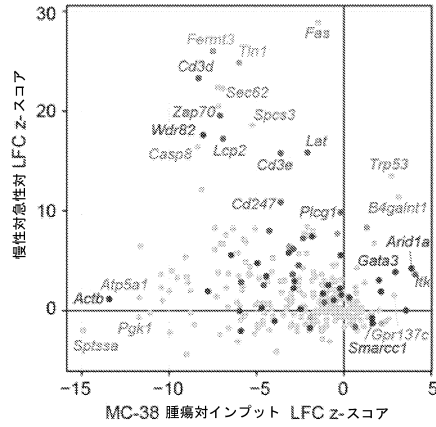


FIG. 12B

【図 12 C】

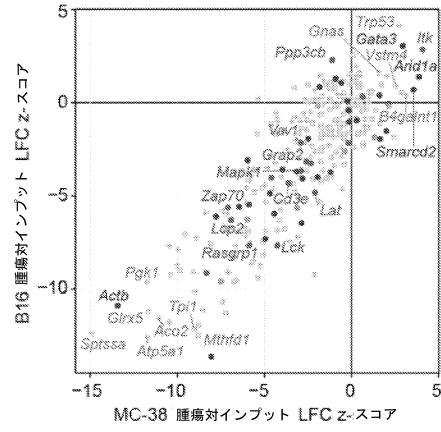


FIG. 12C

10

【図 12 D】

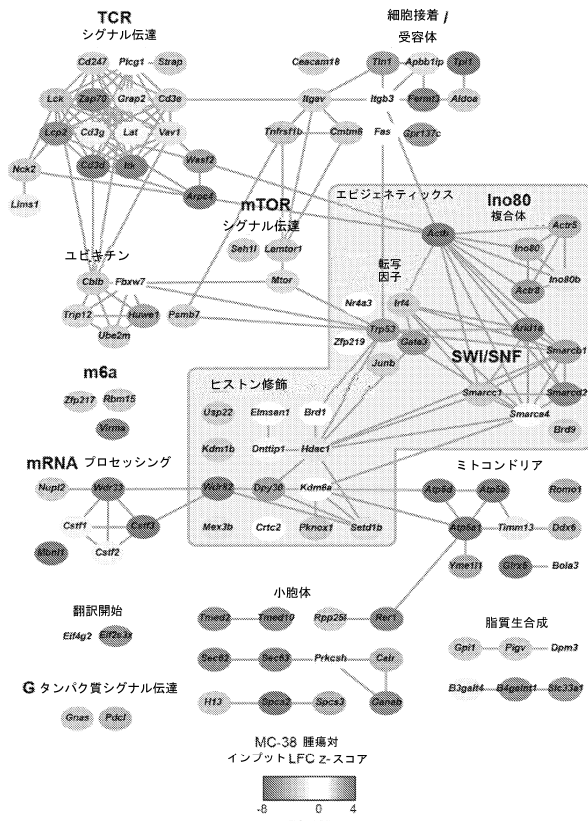


FIG. 12D

【図 12 E】

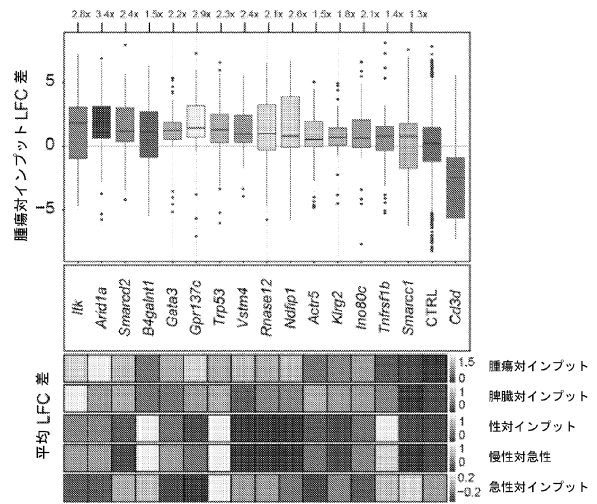


FIG. 12E

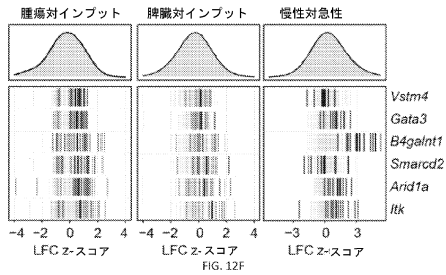
20

30

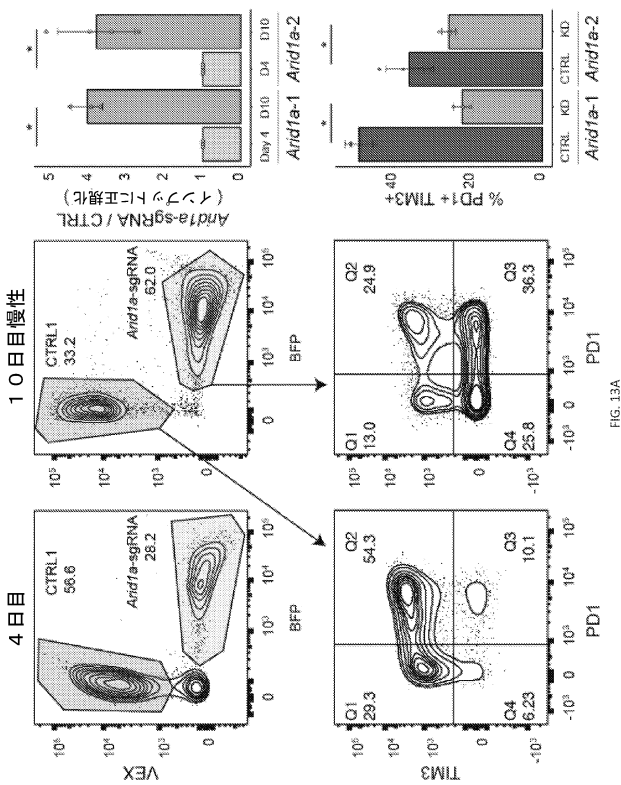
40

50

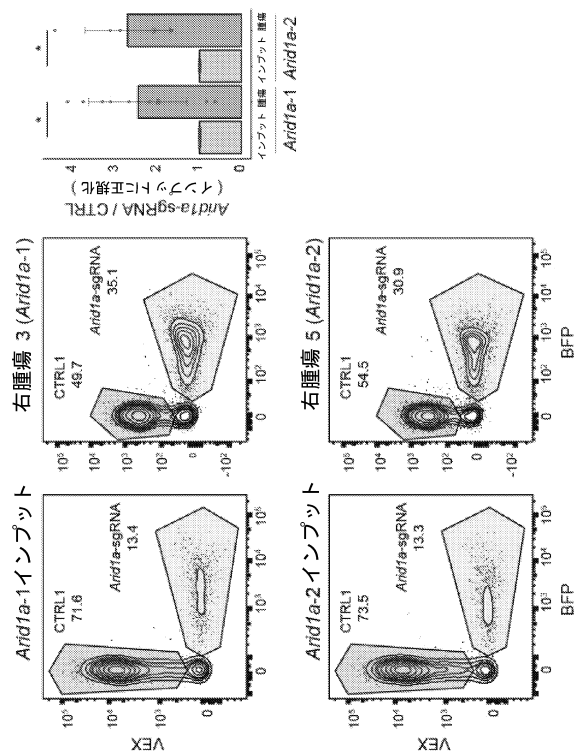
【図 1 2 F】



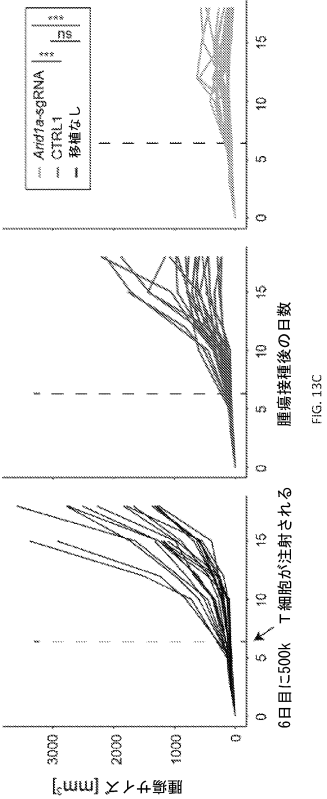
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



10

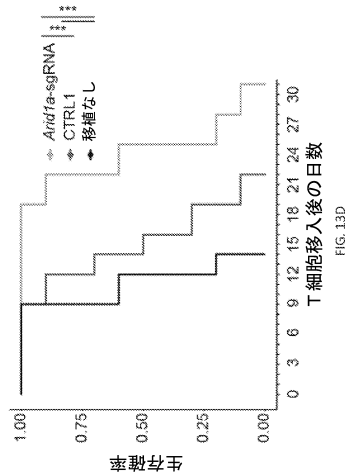
20

30

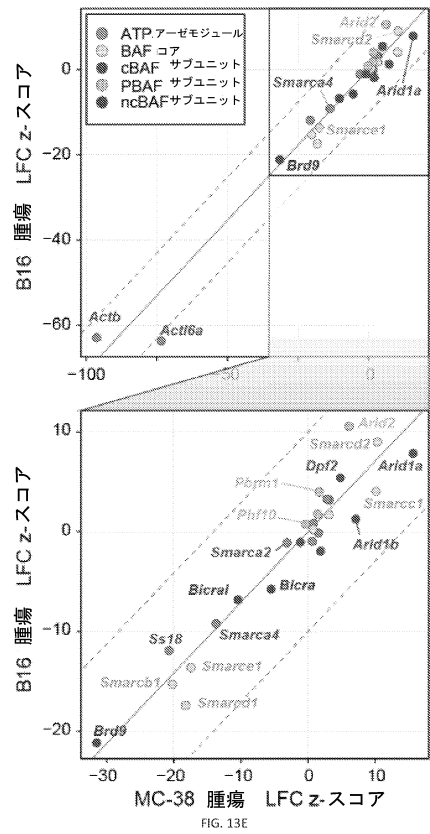
40

50

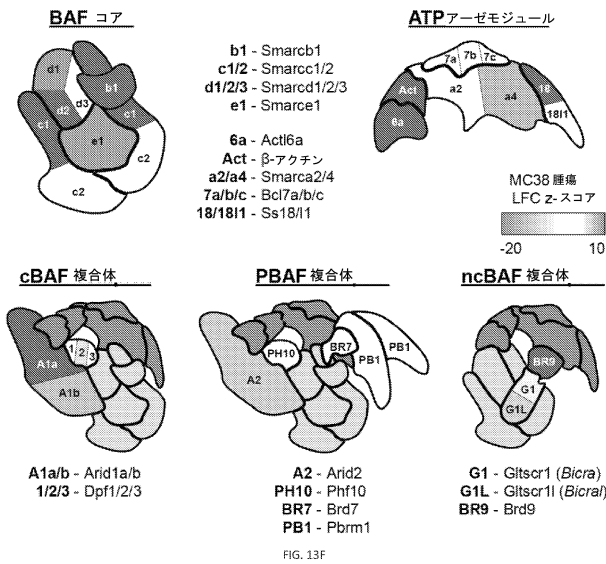
【図 13 D】



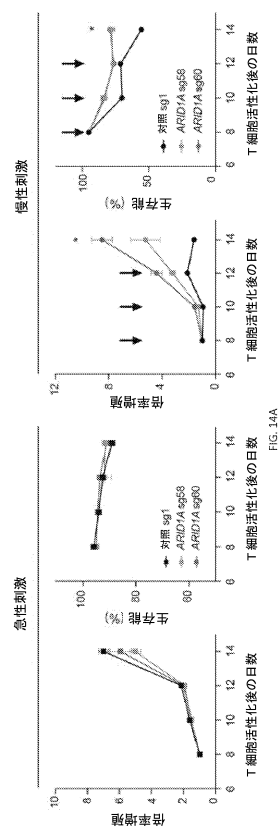
【図 13 E】



【図 13 F】



【図 14 A】



10

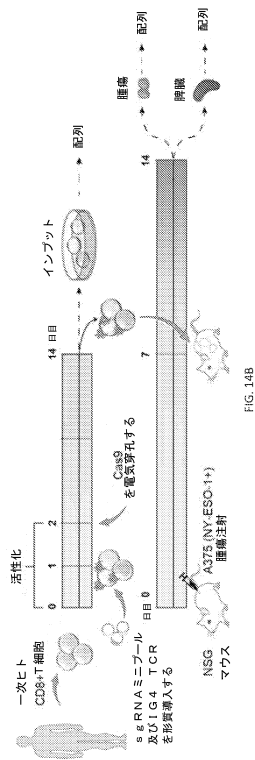
20

30

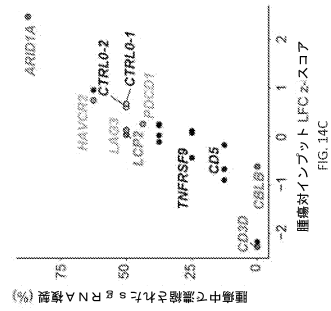
40

50

【図 1 4 B】



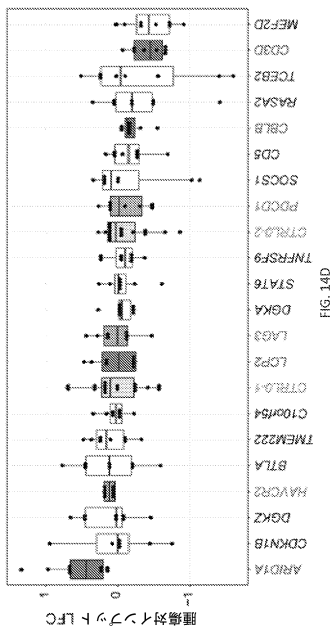
【図 1 4 C】



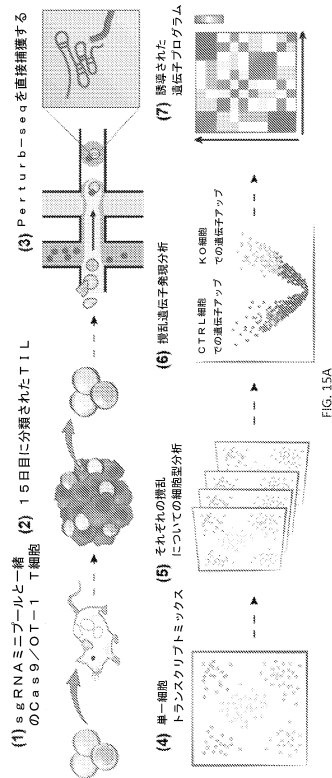
10

20

【図 1 4 D】



【図 1 5 A】

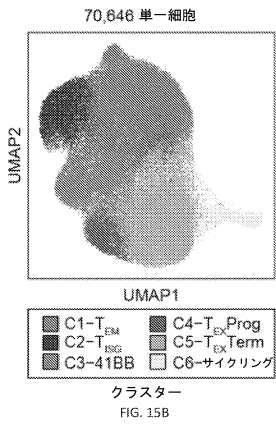


30

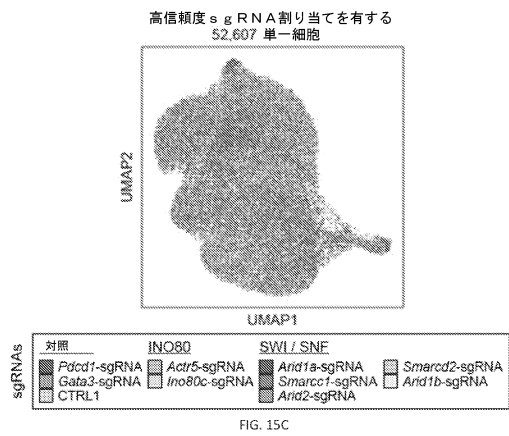
40

50

【図 15 B】

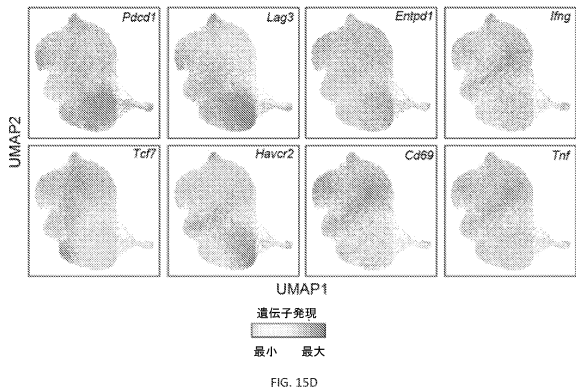


【図 15 C】

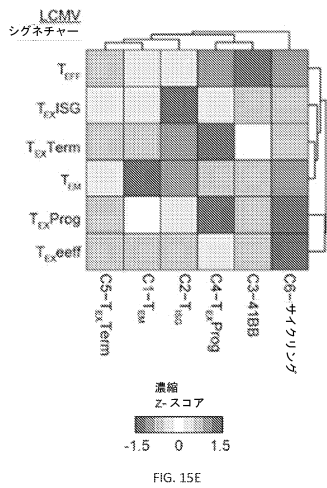


10

【図 15 D】



【図 15 E】



20

30

40

50

【 ㊦ 1 5 F 】

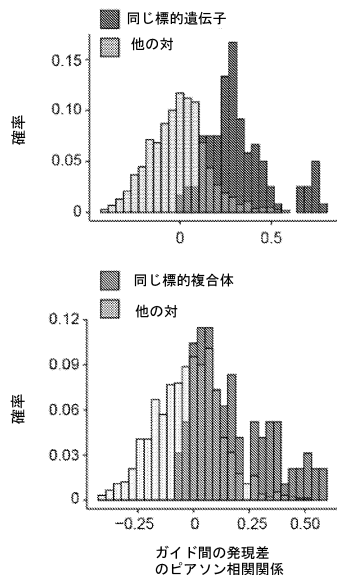


FIG. 15F

【 図 1 5 G 】

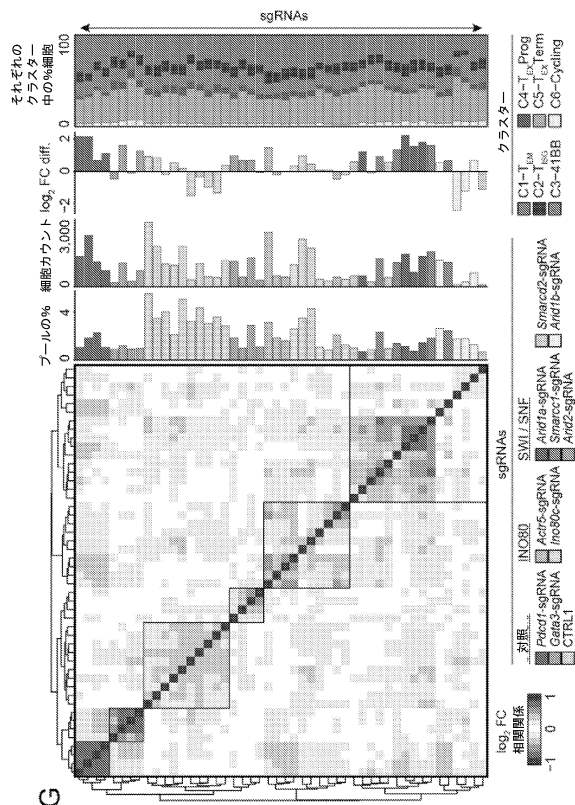


FIG. 15G

10

20

【 図 1 6 A 】

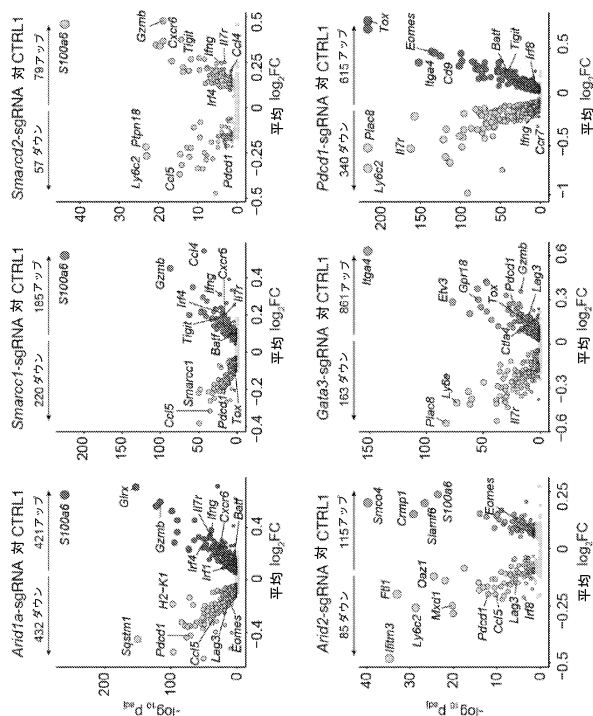


FIG. 16A

【 図 1 6 B 】

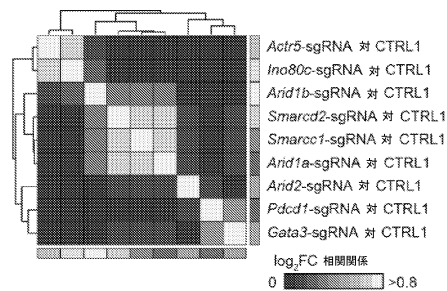


FIG. 16B

30

40

50

【図 16C - 1】

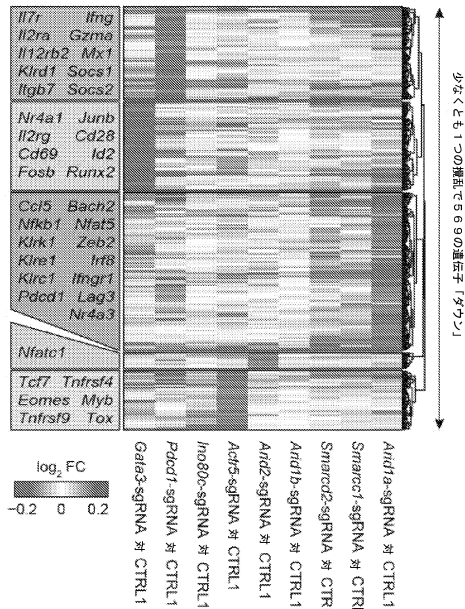


FIG. 16C

【図 16C - 2】

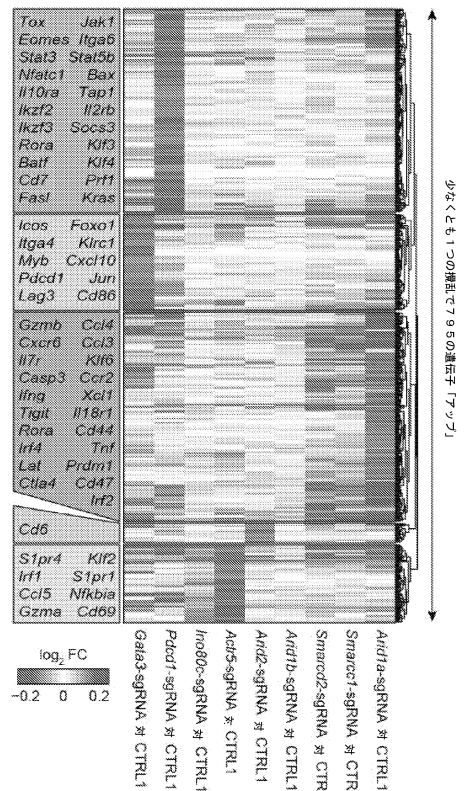
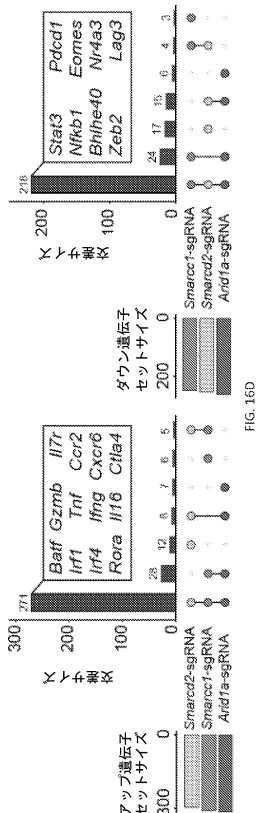
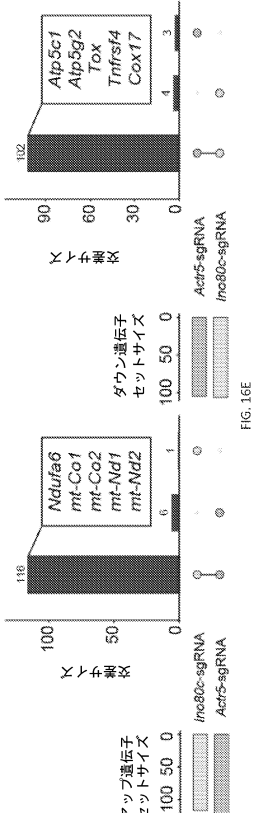


FIG. 16C, 続き

【図 16D】



【図 16E】



10

20

30

40

50

【 図 1 6 F 】

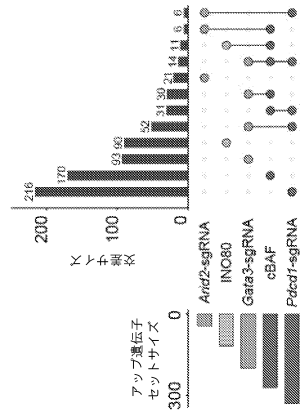


FIG. 16F

【 図 1 6 G 】

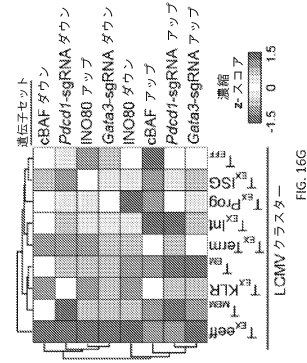


FIG. 16G

10

【 図 1 6 H 】

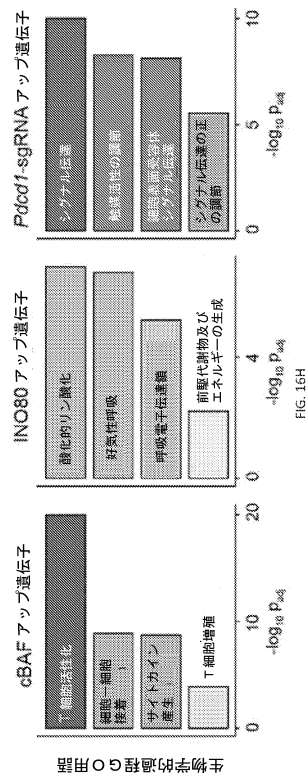


FIG. 16H

【 図 1 7 A 】

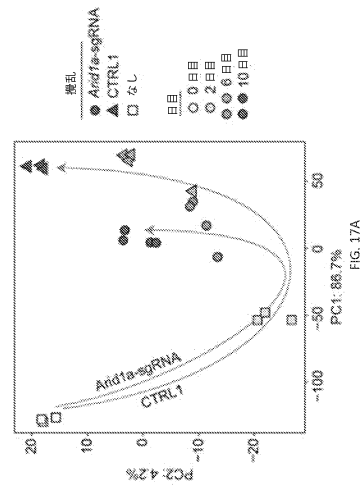


FIG. 17A

20

30

40

50

【図 17 B】

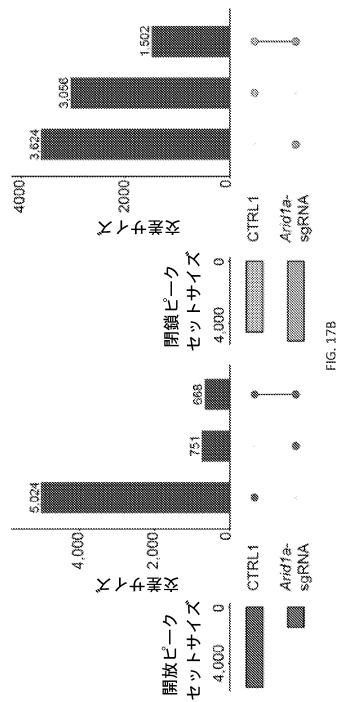


FIG. 17B

【図 17 C】

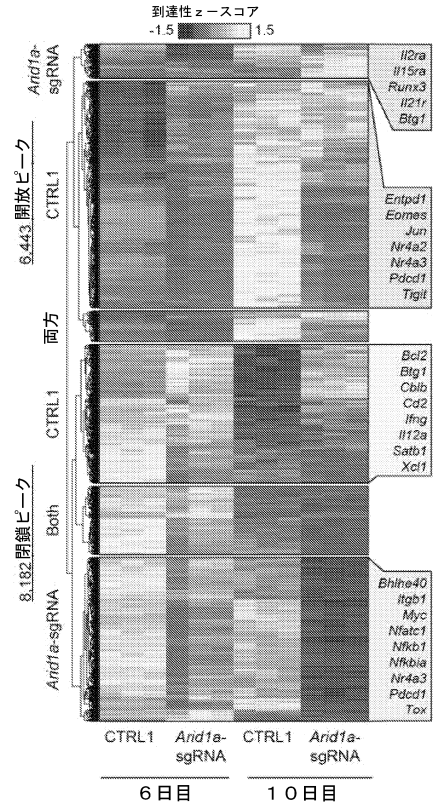


FIG. 17C

【図 17 D】

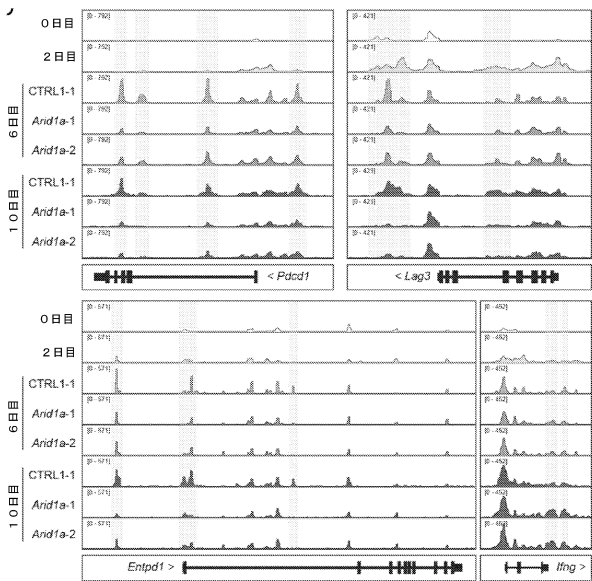


FIG. 17D

【図 17 E】

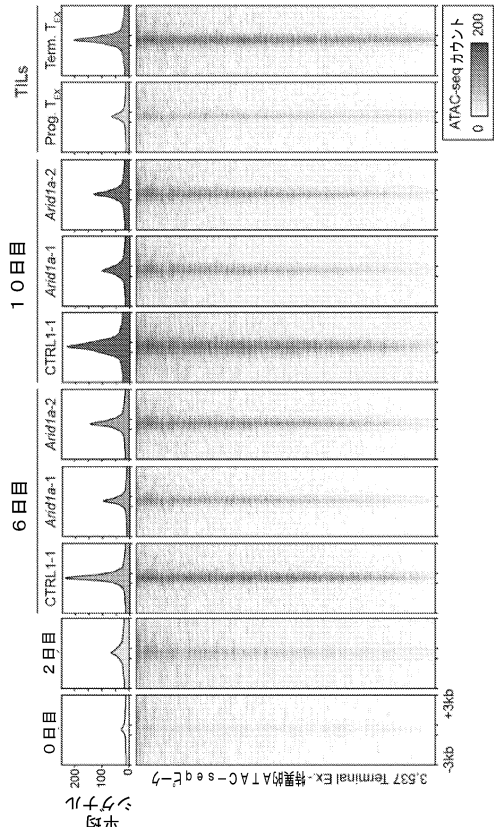


FIG. 17E

10

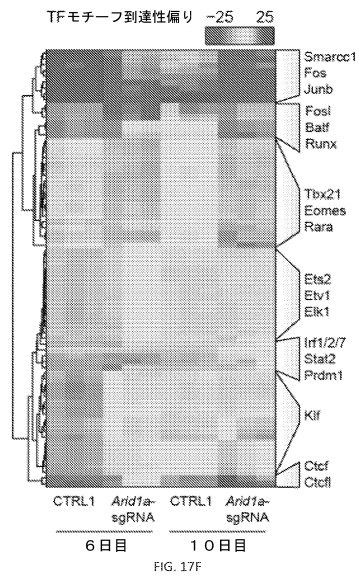
20

30

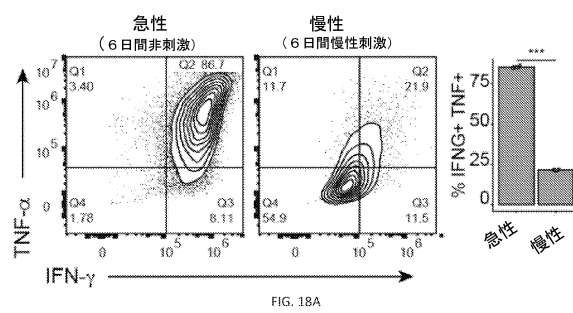
40

50

【図 17 F】

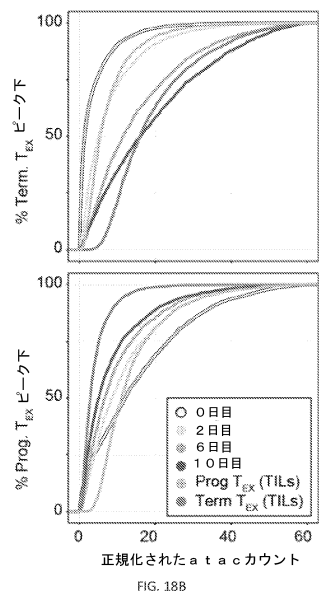


【図 18 A】

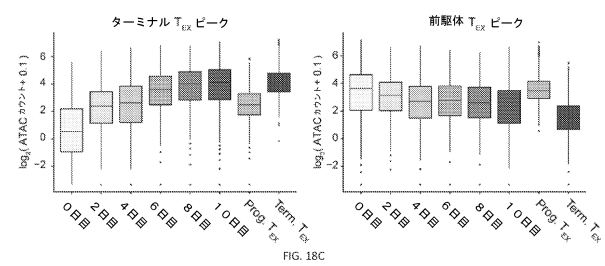


10

【図 18 B】



【図 18 C】



20

30

40

50

【図 19 A】

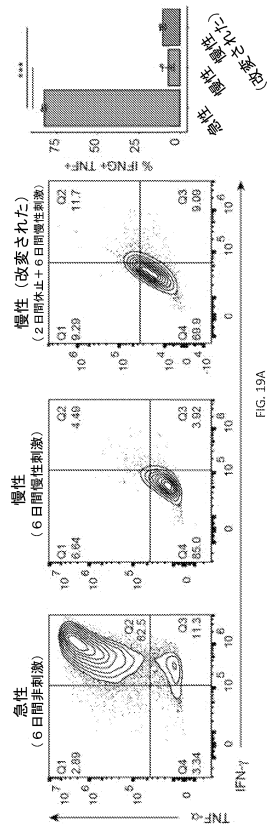


FIG. 19A

【図 19 B】

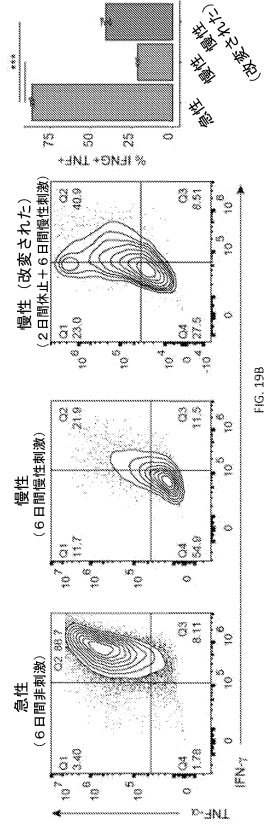


FIG. 19B

【図 19 C】

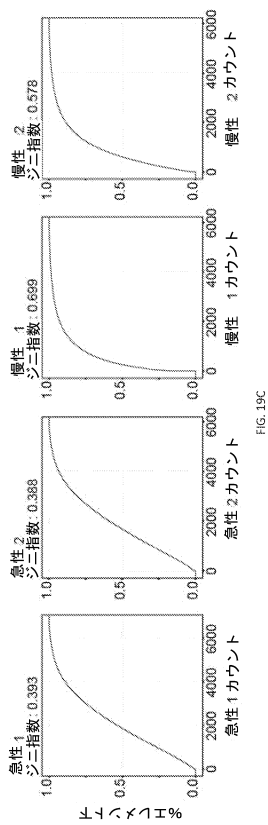


FIG. 19C

【図 20 A - 1】

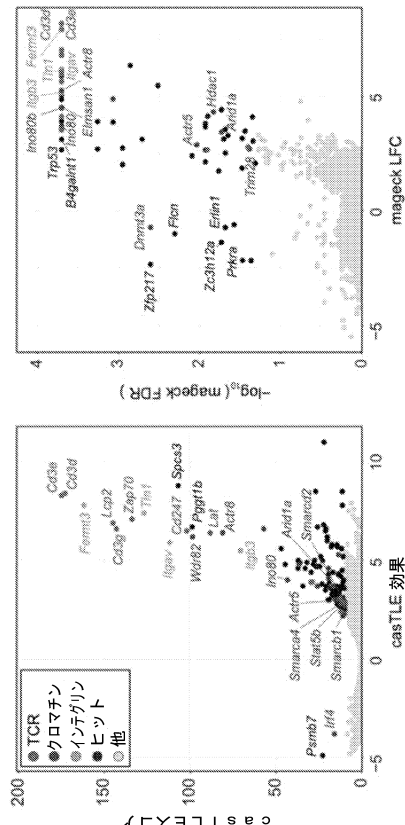


FIG. 20A

10

20

30

40

50

【 図 2 0 A - 2 】

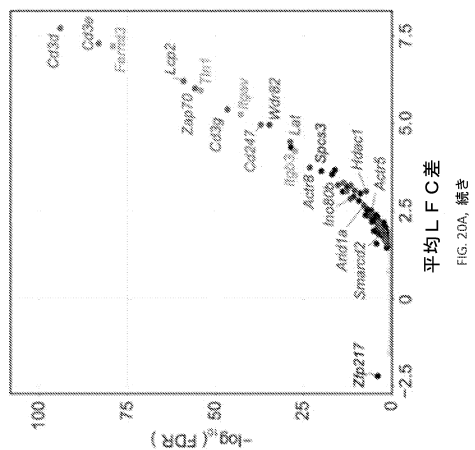


FIG. 20A, 続き

【 図 2 0 B 】

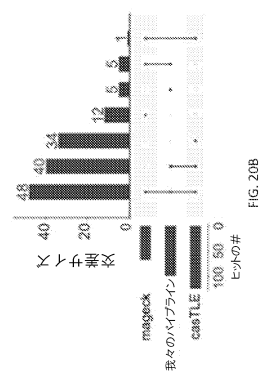


FIG. 20B

10

【 図 2 0 C 】

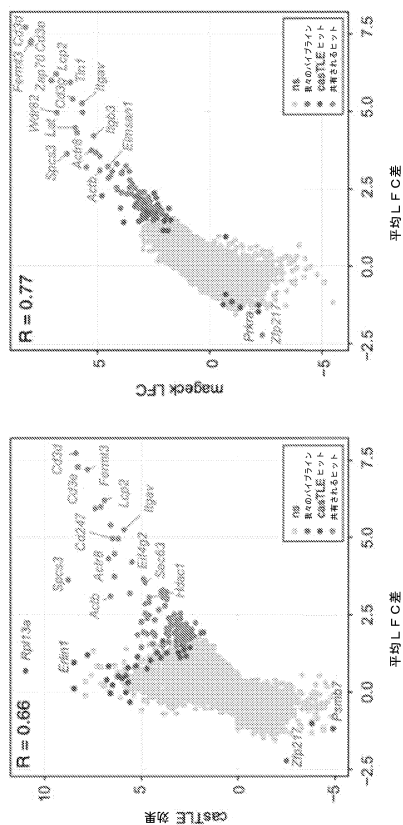


FIG. 20C

【 図 2 0 D 】

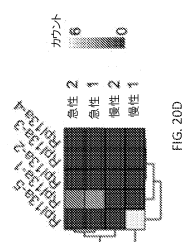


FIG. 20D

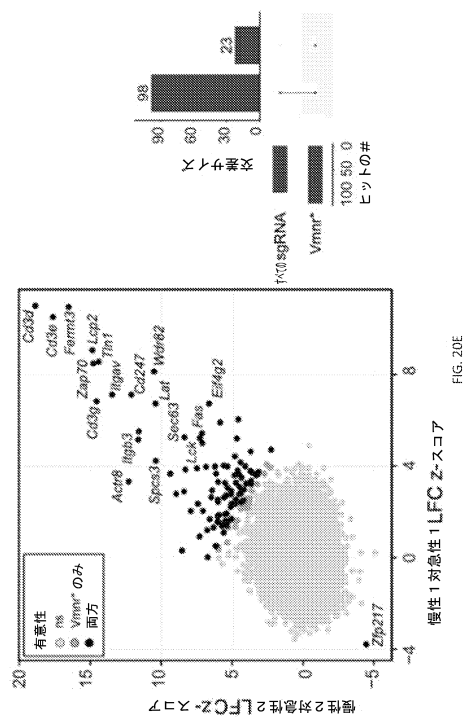
20

30

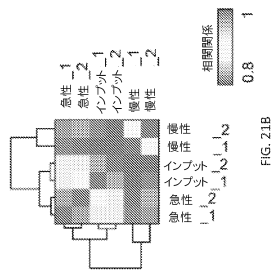
40

50

【図 20 E】



【図 21 B】



【図 21 A】

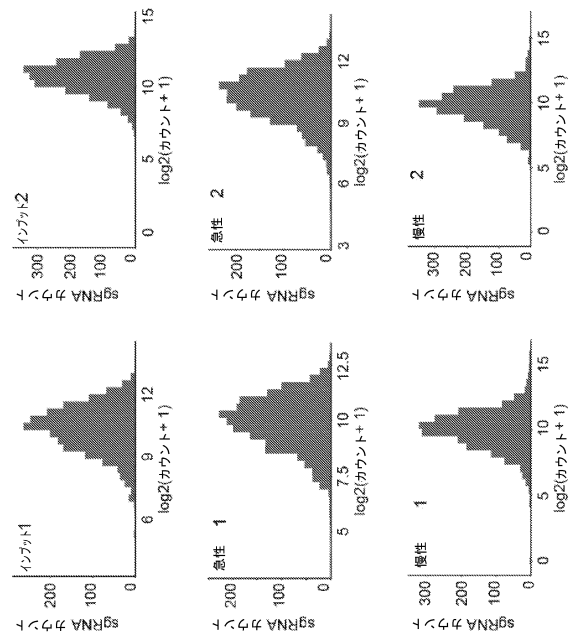
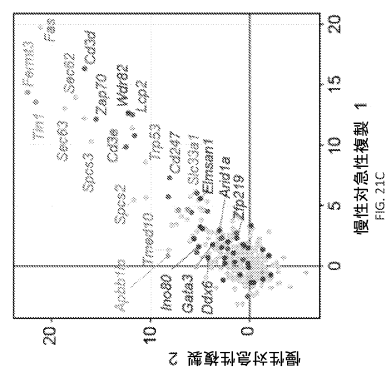


FIG. 21A

【図 21 C】



10

20

30

40

50

【図 2 1 D】

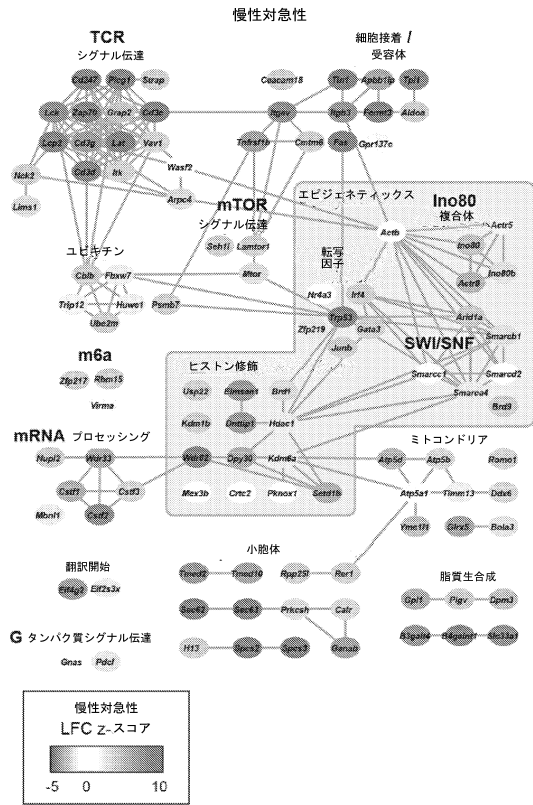


FIG. 21D

【図 2 1 E】

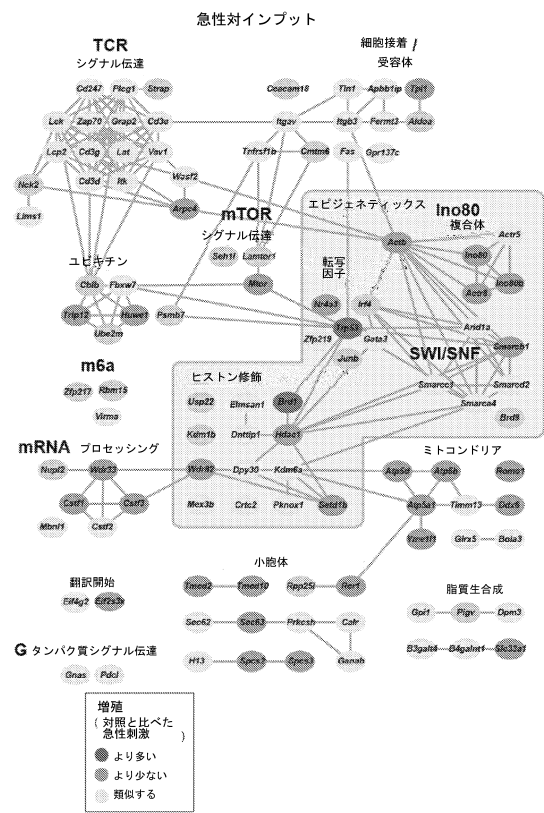


FIG. 21E

10

20

【図 2 2 A - 1】

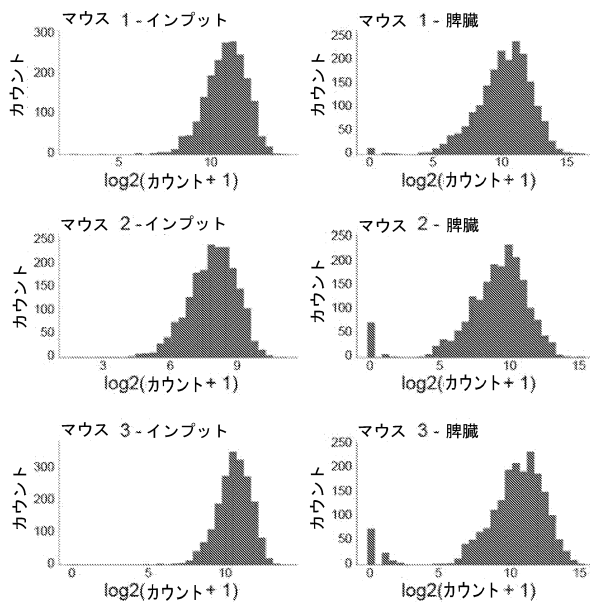
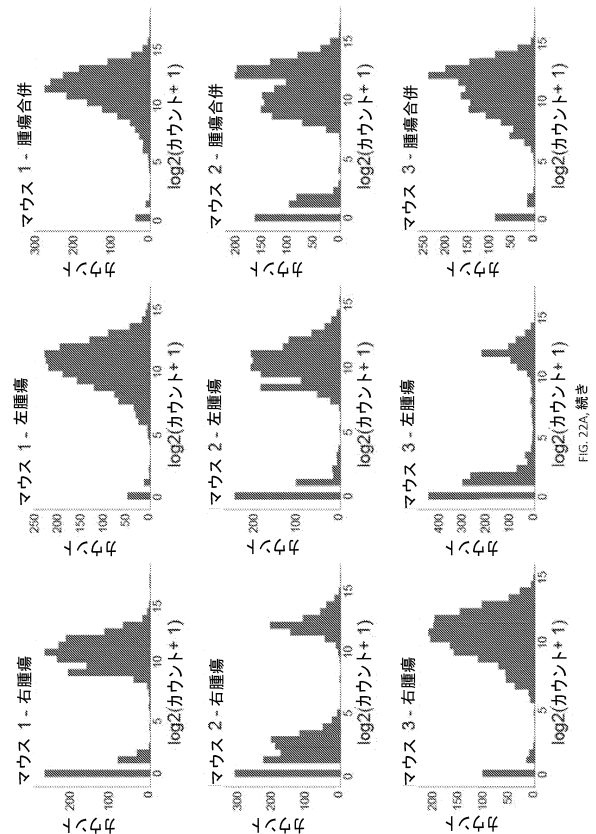


FIG. 22A

【図 2 2 A - 2】

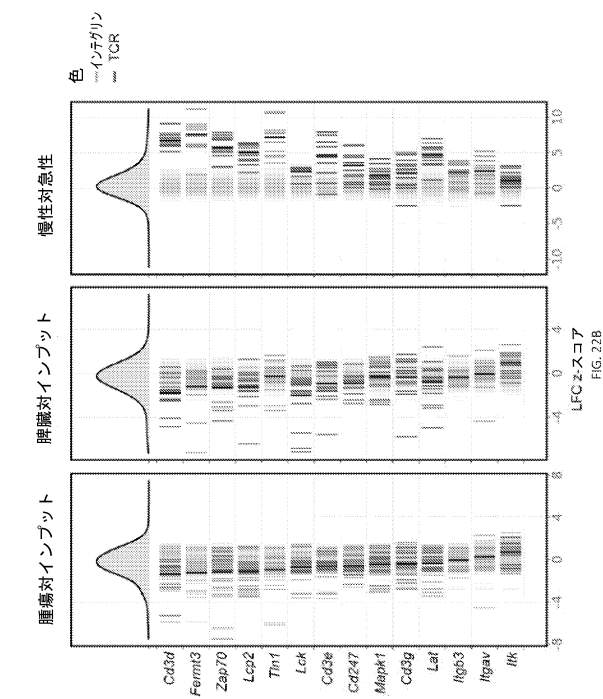


30

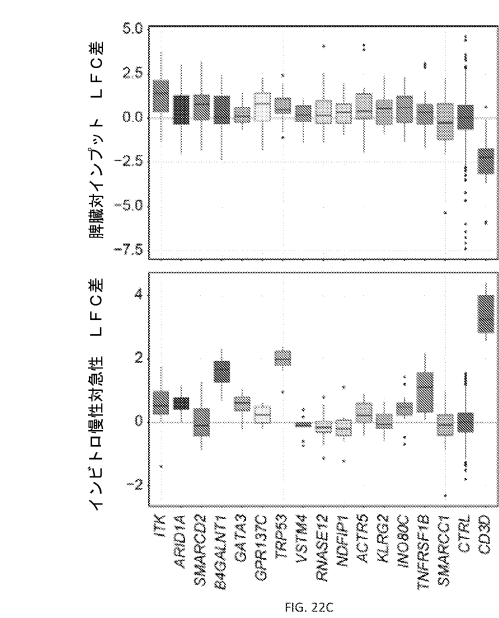
40

50

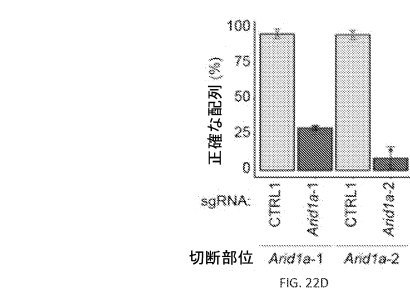
【図 2 2 B】



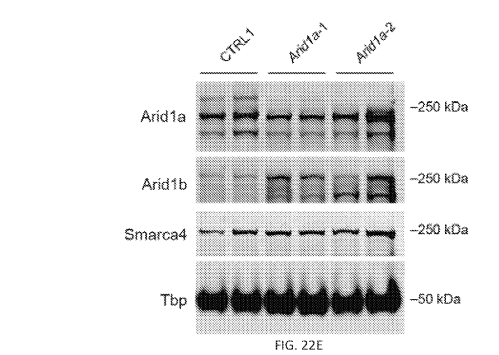
【図 2 2 C】



【図 2 2 D】



【図 2 2 E】



10

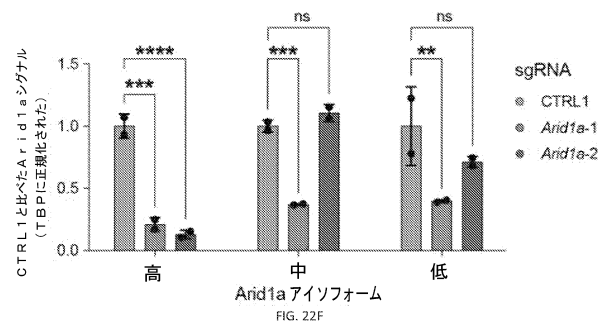
20

30

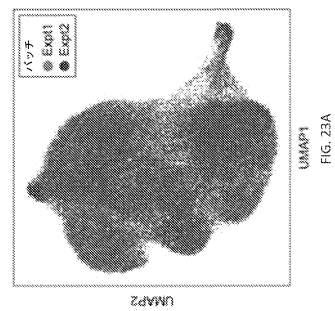
40

50

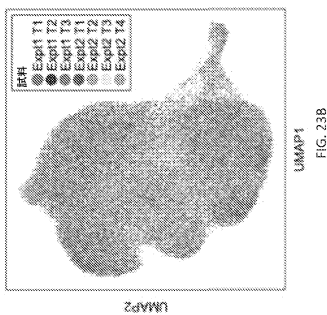
【 2 2 F 】



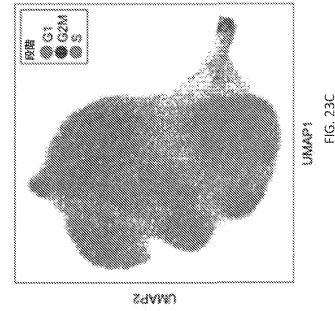
【 2 3 A 】



【 2 3 B 】



【 2 3 C 】



10

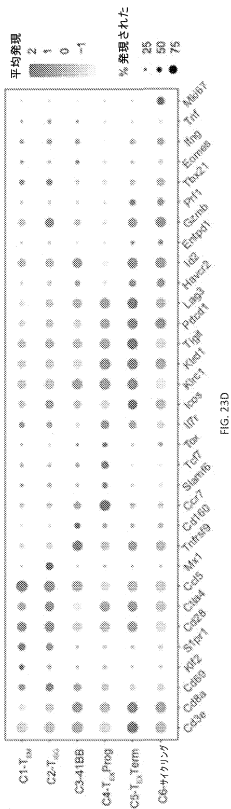
20

30

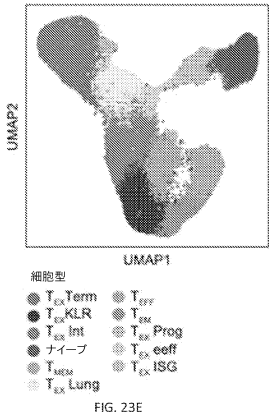
40

50

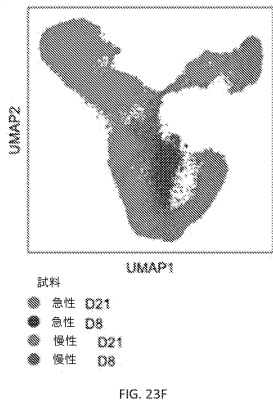
【図 2 3 D】



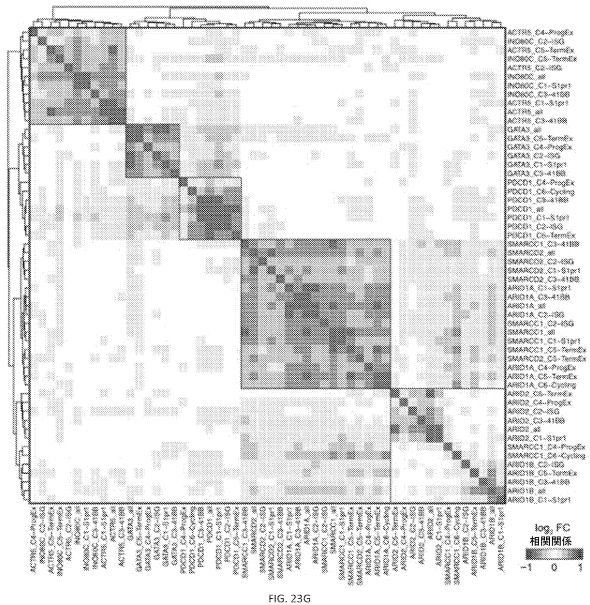
【図 2 3 E】



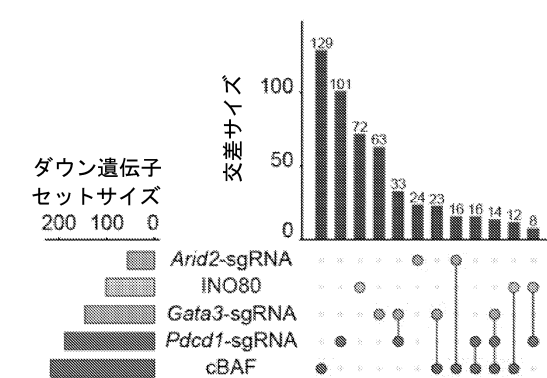
【図 2 3 F】



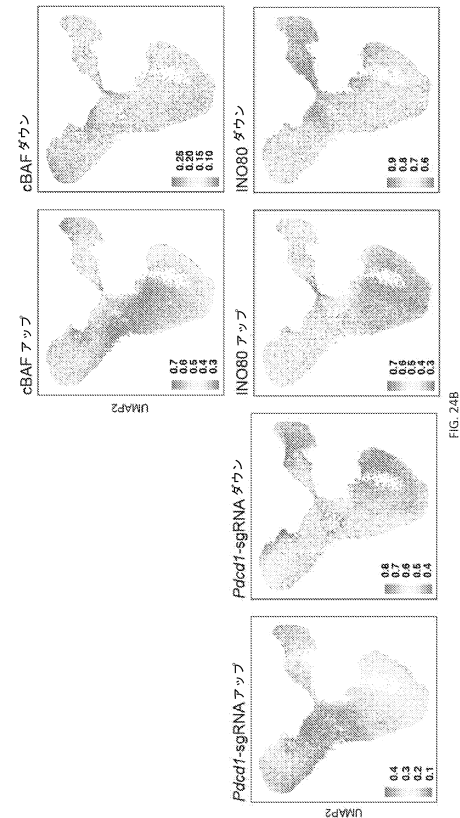
【図 2 3 G】



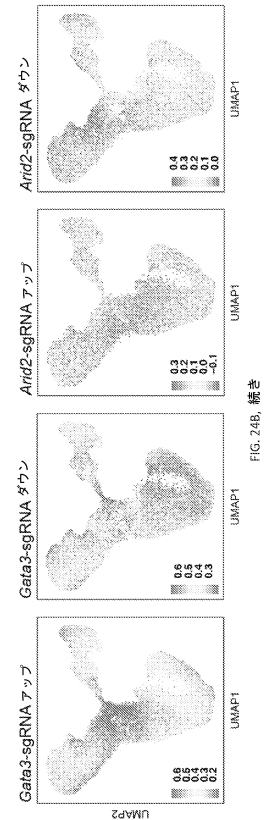
【 図 2 4 A 】



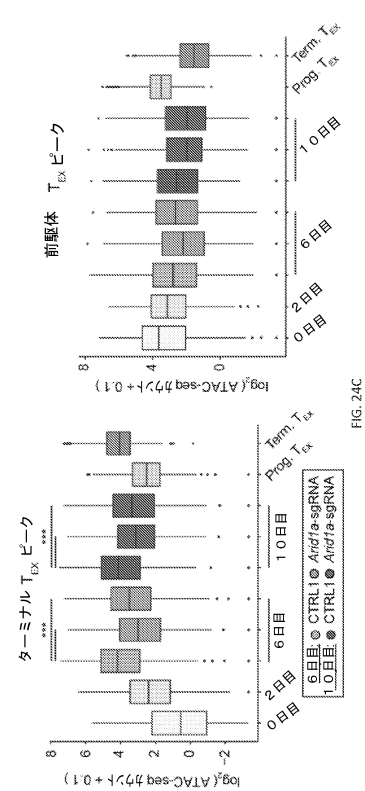
【 図 2 4 B - 1 】



【 図 2 4 B - 2 】



【 図 2 4 C 】



10

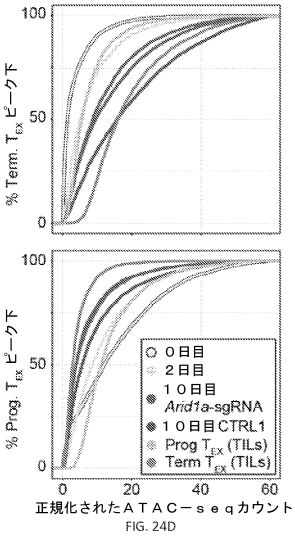
20

30

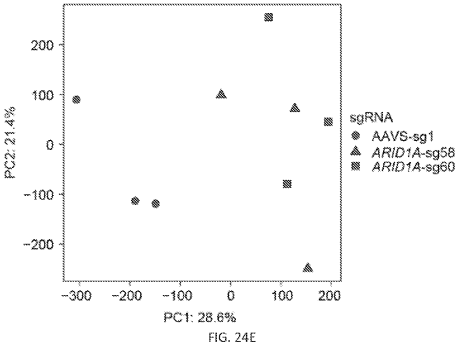
40

50

【 図 2 4 D 】

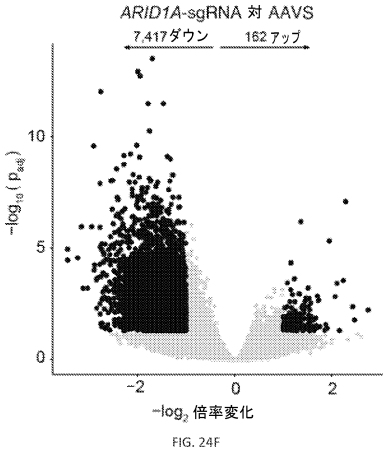


【 図 2 4 E 】

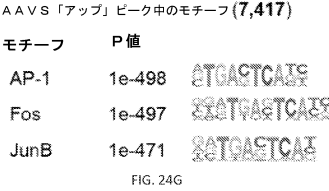


10

【 図 2 4 F 】



【 図 2 4 G 】



20

30

【 配列表 】

2024527997000001.xml

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2022/074251

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - INV. - A61K 35/17; A61K 38/46 (2022.01) ADD. - A61K 38/00; C12N 5/10; C12P 19/34 (2022.01) CPC - INV. - A61K 35/17; C12N 5/0636 (2022.08) ADD. - C12N 5/10; C12P 19/34; A61K 38/465 (2022.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/198340 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 01 October 2020 (01.10.2020) entire document	1, 3, 5, 6, 20-23, 44-47
Y	US 2021/0071139 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 March 2021 (11.03.2021) entire document	1, 3, 5, 6, 20-23, 44-47
A	US 2019/0183932 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 20 June 2019 (20.06.2019) entire document	1, 3, 5, 6, 20-23, 44-47
A	WO 2020/219682 A2 (ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL INC.) 29 October 2020 (29.10.2020) entire document	1, 3, 5, 6, 20-23, 44-47
P, X	BELK et al. "Genome-wide CRISPR screens of T cell exhaustion identify chromatin remodeling factors that limit T cell persistence," bioRxiv, 21 April 2022 (21.04.2022), Pgs. 1-16, [retrieved on 31.10.2022]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.20.488974v1.full.pdf">https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.20.488974v1.full.pdf</a> >. entire document	1, 3, 5, 6, 20-23, 44-47
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2022		Date of mailing of the international search report <b>NOV 22 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer <b>Taina Matos</b> Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/074251
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
<div>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</div> <div><div>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</div><div><div>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13/er. 1(a)).</div><div><input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</div></div><div>2. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</div><div>3. Additional comments:</div></div>		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/074251

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-19, 25-43, 49-56, 60-89  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 3-6, 20-23, 44-47

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2022/074251

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

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

Group I+: claims 1-6, 20-24, and 44-48 are drawn to engineered T cells, methods of making therapeutic T cells, and methods of preventing T cell exhaustion comprising the same.

Group II: claims 57-59 are drawn to methods for screening for genes which facilitate T cell exhaustion.

The first invention of Group I+ is restricted to an engineered T cell lacking a gene comprising INO80C, methods of making a therapeutic T cells, and methods of preventing T cell exhaustion comprising the same. It is believed that claims 1, 3, 5, 6, 20-23, and 44-47 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on an engineered T cell lacking a gene encoding INO80C.

Applicant is invited to elect additional engineered T cells to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an engineered T cell lacking a gene comprising GATA3, methods of making a therapeutic T cells, and methods of preventing T cell exhaustion comprising the same. Additional engineered T cells will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

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

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternative genes where "an engineered T cell lacking at least one gene selected from the group consisting of: INO80C, GATA3, ARID1A, WDR82, TRP53, GPR137C, ZFP219, HDAC1, ELMSAN1, and ACTR8."

The special technical features of Group I+, engineered T cells, methods of making therapeutic T cells, and methods of preventing T cell exhaustion comprising the same, are not present in Group II, and the special technical features of Group II, methods for screening for genes which facilitate T cell exhaustion, are not present in Group I+.

Additionally, even if Groups I+ and II were considered to share the technical features of an engineered T cell lacking a gene; an engineered T cell lacking at least one chromatin remodeling protein or a gene encoding thereof; a method of making a therapeutic T cell, comprising the steps of: obtaining a sample comprising a T cell; altering the DNA of the T cell to knockout or disrupt a gene, and engineering the T cell to express an exogenous receptor; a method of making a therapeutic T cell, comprising the steps of: obtaining a sample comprising a T cell; altering the DNA of the T cell to knockout or disrupt at least one gene encoding a chromatin remodeling protein; and engineering the T cell to express an exogenous receptor; a method of preventing T cell exhaustion comprising genetically modifying the T cell to lack a gene; and a method of preventing T cell exhaustion comprising genetically modifying the T cell to lack at least one chromatin remodeling protein or a gene encoding thereof, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art as disclosed by WO 2020/014235 to The Regents of The University Of California (hereinafter, "California"), WO 2020/219682 to St. Jude Children's Research Hospital Inc. (hereinafter, "St. Jude"), and US 2019/0183932 to The Board Of Trustees Of The Leland Stanford Junior University (hereinafter, "Stanford").

Specifically, California teaches an engineered T cell lacking a gene (Claim 15, [t]he genetically modified T cell of claim 12, wherein the T-cell inhibitory gene is ARID1A; Para. [0017], [t]he term "inhibiting expression" refers to inhibiting or reducing the expression of a gene or a protein ... methods may introduce nucleic acid substitutions, additions, and/or deletions into the wild-type gene); and an engineered T cell lacking at least one chromatin remodeling protein or a gene encoding thereof (Claim 15, [t]he genetically modified T cell of claim 12, wherein the T-cell inhibitory gene is ARID1A; Para. [0017], [t]he term "inhibiting expression" refers to inhibiting or reducing the expression of a gene or a protein ... methods may introduce nucleic acid substitutions, additions, and/or deletions into the wild-type gene).

Further, St. Jude teaches a method of making a therapeutic T cell (Abstract, modified T cells manufactured using the methods provided by this invention ... methods of using the modified T cells for treating a disease), comprising the steps of: obtaining a sample comprising a T cell; altering the DNA of the T cell to knockout or disrupt a gene (Para. [0020], the method comprises: a) isolating a T cell from the subject or a donor; b) modifying a Regnase-1 gene or gene product in the T cell such that the expression and/or function of Regnase-1 in the T cell is reduced or eliminated), and engineering the T cell to express an exogenous receptor (Para. [0024], the T cell is further engineered to express a T cell receptor or a chimeric antigen receptor (CAR)).

Further, Stanford teaches a method of preventing T cell exhaustion comprising genetically modifying the T cell to lack a gene (Abstract, methods ... In preventing exhaustion of engineered (e.g., chimeric antigen receptor (CAR) T cells); Para. [0028], FIG. 8A-D shows that the knockdown of inhibitory AP-1 family members JunB and BATF3 increases IL2 production in exhausted CAR T cells. (A) CRISPR gene knockout (KO) of JunB in HA-28Z exhausted CART cells).

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z

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,N  
E,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,  
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J  
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY  
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T  
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW  
ー・オー・ボックス・20386、メイン・クワッド、ビルディング・170、サード・フロア、  
オフィス・オブ・ザ・ジェネラル・カウンセル

(72)発明者   ベルク , ジュリア  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94305 - 2038、スタンフォード、ピー・オー・ボック  
ス・20386、メイン・クワッド、ビルディング・170、サード・フロア、オフィス・オブ・  
ザ・ジェネラル・カウンセル

F ターム (参考)   4B063   QA01 QA05 QQ08 QR77 QR80  
4B065   AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AB10 AC14 CA24 CA44  
4C084   AA19 NA05 ZB26 ZB31  
4C087   AA01 AA02 AA03 BB64 BB65 MA02 NA14 ZB26 ZB31