

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-504143

(P2018-504143A)

(43) 公表日 平成30年2月15日 (2018.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	4 C O 8 4
<b>C O 7 K 14/705 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/705	4 C O 8 7
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-557488 (P2017-557488)  
 (86) (22) 出願日 平成28年1月25日 (2016.1.25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年8月28日 (2017.8.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/051468  
 (87) 国際公開番号 W02016/120217  
 (87) 国際公開日 平成28年8月4日 (2016.8.4)  
 (31) 優先権主張番号 PA201570044  
 (32) 優先日 平成27年1月26日 (2015.1.26)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

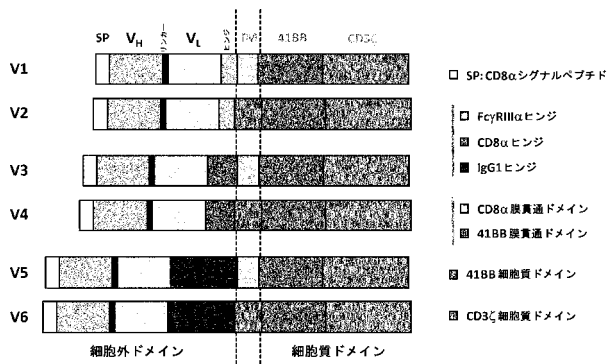
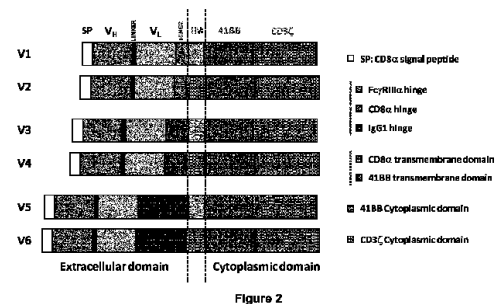
(71) 出願人 512213549  
 セレクトイス  
 C E L L E C T I S  
 フランス、75013 パリ、リュ  
 ラ クロワ ジャリ 8  
 8 rue de la Croix J  
 arry, 75013 Paris,  
 France  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん免疫治療のための抗HSP70特異的キメラ抗原受容体 (CAR)

## (57) 【要約】

本発明は、免疫細胞の特異性および反応性を選択された膜抗原へ向け直すことができる、組換えキメラタンパク質であるキメラ抗原受容体 (CAR)、より具体的には、細胞外リガンド結合がHSP70陽性細胞に対する特異的な免疫を付与する抗HSP70モノクローナル抗体に由来するscFvであるものに関する。そのようなCARを賦与された操作された免疫細胞は、具体的には白血病の処置のために特に適している。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

HSP70に特異的な細胞外リガンド結合ドメイン、  
膜貫通ドメイン、および  
細胞質シグナリングドメイン  
を少なくとも含む、熱ショックタンパク質70（hHSP70）特異的キメラ抗原受容体（抗HSP70 CAR）。

**【請求項 2】**

HSP70に特異的な細胞外リガンド結合ドメイン、  
膜貫通ドメイン、および  
細胞質シグナリングドメイン  
を少なくとも含み、ただし「変異HSP70-2」抗原には結合しない、HSP70特異的キメラ抗原受容体（抗HSP70 CAR）。 10

**【請求項 3】**

ヒト膜HSP70抗原（mHSP70-1抗原）に結合する、請求項1記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体（CAR）。

**【請求項 4】**

ヒトmHSP70-1抗原に結合する、請求項1または2記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体（CAR）。 20

**【請求項 5】**

共刺激ドメインをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 6】**

CD28および/または4-1BBの共刺激ドメインをさらに含む、請求項1記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 7】**

膜貫通ドメインがCD8 膜貫通ドメインを含む、請求項1～3のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 8】**

ヒンジをさらに含む、請求項1～4のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。 30

**【請求項 9】**

細胞質シグナリングドメインがT細胞活性化ドメインを含む、請求項1～4のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 10】**

単一ポリペプチドの形態で発現される、請求項1～6のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 11】**

細胞外リガンド結合ドメインが、モノクローナル抗HSP70抗体に由来するドメインを含む、請求項1～7のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。 40

**【請求項 12】**

細胞外リガンド結合ドメインが、少なくとも1種のモノクローナル抗HSP70抗体のVHドメインおよびVLドメインに由来する相補性決定領域（CDR）を含む、請求項8記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 13】**

CDRがSEQ ID NO：13～15および18～20より選択される、請求項9記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

**【請求項 14】**

図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、 50

該構造が、モノクローナル抗HSP70抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む、  
請求項1～10のいずれか一項記載のHSP70特異的scCAR。

【請求項15】

構造V1がFc RIII ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、請求項1～11のいずれか一項記載のHSP70特異的scCAR。

【請求項16】

構造V3がCD8 ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、請求項1～11のいずれか一項記載のHSP70特異的scCAR。

10

【請求項17】

構造V5がIgG1ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、請求項1～11のいずれか一項記載のHSP70特異的scCAR。

【請求項18】

VHおよびVLが、SEQ ID NO：11～12およびSEQ ID NO：16～17より選択されるポリペプチド配列と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～14のいずれか一項記載のHSP70特異的scCAR。

【請求項19】

4-1BB由来の共刺激ドメインがSEQ ID NO：8と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～15のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

20

【請求項20】

CD3 シグナリングドメインがSEQ ID NO：9と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～16のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項21】

Fc RIII ヒンジがSEQ ID NO：3と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～12または15～17のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項22】

CD8 ヒンジがSEQ ID NO：4と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～11、13、または15～17のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項23】

IgG1ヒンジがSEQ ID NO：5と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～11または14～19のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

30

【請求項24】

CD8 膜貫通ドメインがSEQ ID NO：6と少なくとも80%の同一性を有する、請求項1～20のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項25】

HSP70に特異的ではない別の細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む、請求項1～21のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項26】

SEQ ID NO：23または29と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、請求項1～12または15～17または21～22のいずれか一項記載の構造V3のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

40

【請求項27】

SEQ ID NO：21または27と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、請求項1～11、13、15～17、または21～22のいずれか一項記載の構造V1のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

【請求項28】

SEQ ID NO：25または31と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、請求項1～11または14～19または21～22のいずれか一項記載の構造V5のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

50

## 【請求項 29】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項1～25のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 30】

シグナルペプチドがSEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2と少なくとも80%の配列同一性を有する、請求項26記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 31】

細胞外結合ドメインが1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のmAb特異的エピトープを含む、請求項1～30のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

10

## 【請求項 32】

細胞外結合ドメインが1個、2個、3個、または4個のmAb特異的エピトープを含む、請求項1～31のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 33】

細胞外結合ドメインが2個、3個、または4個のmAb特異的エピトープを含む、請求項1～32のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 34】

細胞外結合ドメインが以下の配列を含む、請求項1～33のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体：

20

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ ；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

30

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_2$ ；または

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$

40

式中、

$V_1$ は $V_L$ でありかつ $V_2$ は $V_H$ であるか、または $V_1$ は $V_H$ でありかつ $V_2$ は $V_L$ であり、

$L_1$ は、 $V_H$ 鎖を $V_L$ 鎖へ連結するのに適したリンカーであり、

$L$ は、グリシン残基およびセリン残基を含むリンカーであり、細胞外結合ドメイン内の $L$ の存在は各々、同一の細胞外結合ドメイン内の他の $L$ の存在と同一であってもよくまたは異なってもよく、かつ

$x$ は0または1であり、 $x$ の存在は各々、他のものとは独立に選択され、かつ

エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、mAb特異的エピトープであり、同一であってもよくまたは異なってもよい。

## 【請求項 35】

細胞外結合ドメインが以下の配列を含む、請求項34記載のHSP70特異的キメラ抗原受容

50

[illegible]

Lが、SGGGG、GGGGS、またはSGGGGSである、請求項39記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

20

40

50

## 【請求項 4 1】

エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4が、イブリットマブ、チウキセタン、ムロモナブ-CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブベゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、QBEND-10、アレムツズマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるmAb特異的エピトープより独立に選択される、請求項31～38のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

10

## 【請求項 4 2】

エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4が、SEQ ID NO : 33～SEQ ID NO : 42のいずれか1つのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープより独立に選択される、請求項31～41のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 4 3】

エピトープ1がSEQ ID NO : 33のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、請求項31～42のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 4 4】

エピトープ2がSEQ ID NO : 33またはSEQ ID NO : 35～38のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、請求項31～43のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体

20

## 【請求項 4 5】

エピトープ3がSEQ ID NO : 33またはSEQ ID NO : 35～38のいずれか1つのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、請求項31～44のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 4 6】

エピトープ4がSEQ ID NO : 41または42のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、請求項31～45のいずれか一項記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

## 【請求項 4 7】

請求項1～46のいずれか一項記載のキメラ抗原受容体をコードする、ポリヌクレオチド

30

## 【請求項 4 8】

請求項47記載の核酸を含む、発現ベクター。

## 【請求項 4 9】

請求項1～46のいずれか一項記載の抗HSP70 CARを細胞表面膜に発現する、操作されたリンパ系免疫細胞。

## 【請求項 5 0】

炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、またはヘルパーTリンパ球に由来する、請求項49記載の操作されたリンパ系免疫細胞。

## 【請求項 5 1】

治療において使用するための請求項49または50記載の操作された細胞。

40

## 【請求項 5 2】

患者がヒトである、治療において使用するための請求項49～51のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 3】

状態が、HSP70発現細胞を特徴とする前悪性または悪性のがん状態である、治療において使用するための請求項49～52のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 4】

状態が、HSP70発現細胞の過多を特徴とする状態である、治療において使用するための請求項49～53のいずれか一項記載の操作された細胞。

50

## 【請求項 5 5】

状態が血液がん状態である、治療において使用するための請求項49～54のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 6】

血液がん状態が白血病である、治療において使用するための請求項49～55のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 7】

白血病が急性骨髄性白血病（AML）である、治療において使用するための請求項49～55のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 8】

前記免疫細胞においてTCRの発現が抑制されている、請求項49～57のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 5 9】

前記免疫細胞において少なくとも1種のMHCタンパク質、好ましくは 2mまたはHLAの発現が、阻止または抑制されている、請求項49～58のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 6 0】

少なくとも1種の免疫抑制薬または化学療法薬に対する耐性を付与するために変異させた、請求項49～59のいずれか一項記載の操作された細胞。

## 【請求項 6 1】

Hsp70.1過剰発現細胞に関連した疾患を処置する方法において使用するための、少なくとも、請求項1～46のいずれか一項記載の抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞（例えば、T細胞）と、可溶性Hsp70に対する抗体との組み合わせ。

## 【請求項 6 2】

可溶性Hsp70に対する抗体が、該抗体の投与前と比較して患者の血漿中の可溶性Hsp70のレベルが少なくとも50%、好ましくは75%、より好ましくは90%低下するまで、最初に投与され、

該可溶性Hsp70特異的モノクローナル抗体の投与の後に、抗mHsp70 CAR発現免疫細胞が投与される、

患者へ連続的に投与される請求項61記載の組み合わせ。

## 【請求項 6 3】

血液がん細胞の障害を引き起こすのに有効な量の請求項49～60のいずれか一項記載の操作された細胞と血液がん細胞を接触させる工程を含む、血液がん細胞に障害を与える方法。

## 【請求項 6 4】

少なくとも、請求項1～46のいずれか一項記載の抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞（例えば、T細胞）と、薬物との組み合わせ。

## 【請求項 6 5】

（c）免疫細胞を準備する工程、

（d）請求項1～46のいずれか一項記載の少なくとも1種のHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を該細胞の表面に発現させる工程を含む、免疫細胞を操作する方法。

## 【請求項 6 6】

（d）免疫細胞を準備する工程、

（e）HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを該細胞へ導入する工程、

（f）ポリヌクレオチドを該細胞において発現させる工程を含む、請求項65記載の免疫細胞を操作する方法。

## 【請求項 6 7】

（d）免疫細胞を準備する工程、

（e）抗HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドを該細胞へ導入する工程、

(f) HSP70に特異的ではない少なくとも1種の他のキメラ抗原受容体を導入する工程を含む、請求項66記載の免疫細胞を操作する方法。

【請求項68】

(c) 請求項1～46のいずれか一項記載の抗HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を表面に発現する免疫細胞を準備する工程、

(b) 該免疫細胞を患者へ投与する工程を含む、その必要のある対象を処置する方法。

【請求項69】

前記免疫細胞がドナーから提供される、請求項68記載の方法。

10

【請求項70】

前記免疫細胞が患者自身から提供される、請求項68記載の方法。

【請求項71】

エピトープに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体が、必要な場合に患者へ投与される、請求項31～46のいずれか一項記載のHSP70特異的CARおよび少なくとも1種のエピトープを発現する操作されたリンパ系免疫細胞を患者において枯渇させるための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

20

熱ショックタンパク質70 (Hsp70) は、急性骨髄性白血病 (AML) などの白血病または結腸直腸がん、肺がん、神経がん、膵臓がん、肝臓転移などの固形腫瘍に罹患している患者において高頻度に過剰発現されることが同定されている。本発明は、免疫細胞の特異性および反応性を、選択された膜抗原HSP70へ向け直すことができる組換えキメラタンパク質であるキメラ抗原受容体 (抗HSP70-CAR) を使用して、HSP70陽性悪性細胞を標的とする方法に関する。これらの抗HSP70 CARは、より具体的には、いくつかの特異的な抗HSP70モノクローナル抗体に由来するscFvを含む細胞外リガンド結合を含む。そのようなCARを賦与された操作免疫細胞は、より高い効率で、がん、具体的には、血液がんを処置するための、様々な細胞治療の一部として、HSP70陽性細胞に対する養子免疫を付与する。

【背景技術】

30

【0002】

発明の背景

エキスピボで生成された抗原特異的T細胞の移入を含む養子免疫治療は、ウイルス感染およびがんを処置するための有望な戦略である。養子免疫治療のために使用されるT細胞は、抗原特異的T細胞の増加または遺伝子操作を通じたT細胞の向け直しのいずれかによって生成され得る (Park, Rosenberg et al. 2011)。ウイルス抗原特異的T細胞の移入は、移植に関連したウイルス感染および稀なウイルス関連悪性疾患の処置のために使用されている、よく確立された手法である。同様に、腫瘍特異的T細胞の単離および移入は、黒色腫の処置において成功が示されている。

【0003】

40

T細胞における新規特異性は、トランスジェニックT細胞受容体またはキメラ抗原受容体 (scCAR) の遺伝子移入を通して、成功裡に生成された (Jena, Dotti et al. 2010)。scCARは、単一の融合分子として1つ以上のシグナリングドメインと会合したターゲティング部分からなる合成受容体である。通常、scCARの結合部分は、フレキシブルリンカーによって結合されたモノクローナル抗体の軽鎖可変断片を含む、単鎖抗体 (scFv) の抗原結合ドメインからなる。受容体またはリガンドのドメインに基づく結合部分も、成功裡に使用されている。第一世代scCARのためのシグナリングドメインは、CD3 鎖またはFc受容体鎖の細胞質領域に由来する。第一世代scCARは、T細胞の細胞傷害を成功裡に向け直すことが示されたが、より長期間の増加および抗腫瘍活性をインビボで提供することはできなかった。scCARによって改変されたT細胞の生存を増強し、増殖を増加させるため、CD28、OX

50



-40 (CD134)、および4-1BB (CD137)を含む共刺激分子に由来するシグナリングドメインが、単独で(第二世代)または組み合わせて(第三世代)付加された。scCARは、リンパ腫および固形腫瘍を含む様々な悪性疾患に由来する腫瘍細胞の表面に発現された抗原に対して、T細胞が向け直されることを、成功裡に可能にしている(Jena, Dotti et al. 2010)。

#### 【0004】

一方、急性骨髄白血病(AML)の導入処置は、ほぼ50年間概して変化しておらず、AMLは、予後不良疾患のままである。AMLは、造血機能障害をもたらす、骨髄における未熟骨髄系細胞の急速な増殖を特徴とする疾患である。標準的な導入化学療法が完全寛解を誘導する場合もあるが、多くの患者が、最終的には再発し、疾患に屈するため、AMLのための新規治療薬の開発が必要とされている。AML細胞の免疫表現型決定における最近の進歩は、将来の治療のための標的となり得る、数種のAML関連細胞表面抗原を明らかにした。細胞内シャペロン機能に加え、熱ショックタンパク質(Hsp)は、がん免疫において重大な役割を果たすことが見出されている。中でも、(Hsp70(遺伝子リファレンスGeneID#3303によってコードされるヒトタンパク質についてのUniprotリファレンス:P0DMV8)のような)70キロダルトンの熱ショックタンパク質は、保存された遍在性に発現される熱ショックタンパク質のファミリーである。熱ショック70kDaタンパク質は、HSP70.1、HSPA1A、またはHSX70という代替名も有する。

10

#### 【0005】

類似した構造を有するタンパク質は、事実上全ての生存生物に存在する。Hsp70は、タンパク質折り畳みのための細胞機構の重要な部分であり、ストレスからの細胞の保護を補助する(Tamura Y et al,1993)。細胞内で過剰発現されたHsp70は、細胞膜に輸送され、細胞外空間にも輸出される。一般に、誘導可能なHsp70は、細胞内タンパク質であると考えられているが、研究者は、正常状態および疾患状態において、末梢循環血中に可溶性Hsp70およびHsp70抗体が検出可能であり、Hsp70は、細胞外に放出され、身体にHsp70抗体を産生させることができることを見出した(Muthoff G et al,2007)。

20

#### 【0006】

Hsp70群の主要な熱誘導可能メンバーであるHsp70は、腫瘍細胞の細胞表面上には検出されるが、正常細胞上には検出されない(Multhoff G et al.,1995)。乳がんを例外として、Hsp70形質膜発現は、結腸直腸、肺、神経細胞、および膵臓のがん、肝臓転移の新鮮に単離されたヒト生検材料、ならびに急性骨髄性白血病を有する患者の白血病芽細胞に見出された(Hantschel M et al.2000)。さらに、Hsp70は、急性骨髄性白血病(AML)の検出のための「腫瘍マーカー」として認定されている(K Steiner et al.,2006)。Hsp70膜発現は、頭頸部がん患者の腫瘍材料および対照組織のナチュラルキラー(NK)細胞のための標的であることが示された(Kleinjung T et al.,2003)。

30

#### 【0007】

これまでの臨床試験におけるHsp70に基づく免疫治療は、全て、慢性骨髄性白血病(CML)のような白血病または黒色腫を処置するための抗原として組換えHsp70タンパク質を使用した予防接種に頼っている。Hsp70 DNAワクチンも、子宮頸がん前がん状態を処置するために試験されている。

40

#### 【0008】

前記のことを考慮して、本発明者らは、免疫細胞の特異性をHsp70陽性細胞へ向け直す、抗Hsp70モノクローナル抗体に基づく特異的なキメラ抗原受容体を賦与された免疫細胞を使用して、Hsp70を標的とするための新しいアプローチを探究した。

#### 【0009】

このアプローチを使用して入手した操作された免疫細胞は、Hsp70陽性悪性細胞を排除するために有効であることが判明した。具体的には、それらは、GvHDのような副作用の低下を可能にする同種TCR陰性の操作された免疫細胞の作製に関して特に有用であるようであった。

#### 【0010】

50

従って、本発明は、養子免疫治療を使用して、Hsp70発現細胞の過多を特徴とする状態によって影響を受けた患者を処置するための道を開く。さらに、本発明は、「既製の」同種治療用生成物として使用され得る操作された同種免疫細胞を提供する。本発明のさらなる利点として、CAR陽性の操作された細胞を化学療法または免疫枯渇処置と適合性（即ち、耐性）であるようにし、それによって、化学療法と免疫治療との間の相乗効果を可能にすることができる。本発明の別の局面は、サイトカインストームのような有害事象が発生した場合に、そのようなエピトープに対する抗体の使用によって、該免疫細胞を枯渇させることを可能にする、CD20ミモトープのような少なくとも1種のエピトープタギング配列を細胞外ドメインが含むCARを発現した、さらに操作された免疫細胞の開発である。

【発明の概要】

【0011】

本発明者らは、異なる設計を有し、抗Hsp70特異的抗体に由来する異なるscFVを含むHsp70特異的単鎖scCARを生成した。

【0012】

具体的には、本発明者らは、異なる構成を有する、抗体に由来するVL鎖およびVL鎖を含む抗Hsp70特異的CAR、具体的には、単鎖CAR（scCAR）を開発し、Hsp70発現細胞に結合し、Hsp70発現がん細胞を選択的に破壊する、高度に特異的かつ極めて選択的なscCAR構築を同定した。

【0013】

本発明は、具体的には、膜HSP70（mHsp70）抗原、好ましくは膜HSP70-1抗原を特異的に標的とするキメラ抗原受容体を目標とする。

【0014】

（例えば、抗CD3/CD28によってコーティングされたビーズおよび組換えIL2による）インビトロの非特異的な活性化の後、ドナー由来の初代T細胞を、これらのscCARを発現するポリヌクレオチドによって、ウイルス形質導入を使用して形質転換した。ある種の場合において、移植片対宿主反応を防止するため、低アロ反応性または非アロ反応性のT細胞を作製するため、より具体的には、TCRの成分（ $\alpha$  - T細胞受容体）の崩壊によって、T細胞をさらに操作した。

【0015】

本発明の別の局面は、必要な場合（有害事象の発生）に、そのようなエピトープに対する抗体の使用によって、該免疫細胞を枯渇させることを可能にする、CD20ミモトープのような少なくとも1種のエピトープタギング配列を細胞外ドメインが含むCARを発現した、さらに操作された免疫細胞の開発である。古典的抗がん薬と組み合わせて使用するための、抗がん薬に対して耐性のT細胞を作製するため、T細胞をさらに操作した。

【0016】

得られた操作されたT細胞は、様々な程度に、HSP70陽性細胞に対してインビトロで反応性を示し、このことから、本発明のscCARが、T細胞の抗原依存性の活性化に寄与し、増殖にも寄与し、従って、免疫治療のために有用であることが示された。

【0017】

得られた操作されたT細胞は、HSP70陽性細胞に対してインビボで反応性を示し、インビボでがん細胞の数を有意に低下させる。

【0018】

本発明の操作されたT細胞は、HSP70陽性細胞に対してインビボで反応性を示すよう設計されており、抗がん薬と同時に使用され得、耐容性が高い。具体的な態様において、本発明の操作されたT細胞は、数回の投与の後ですら効率的なままであり、従って、第1の処置（導入）として、コンソリデーション処置として、古典的抗がん化学療法との組み合わせ処置として、免疫治療のために有用である。本発明のCARをコードするポリペプチドおよびポリヌクレオチドの配列は、本明細書中に詳述される。

【0019】

本発明の操作された免疫細胞は、急性骨髄性白血病（AML）の処置のような治療的適用

10

20

30

40

50

のため、そして結腸直腸、肺、神経細胞、膵臓のがん、肝臓転移、または頭頸部がんのような固形腫瘍の処置のために特に有用である。

【0020】

最後に、本発明は、連続的に、可溶性HSP70に対する抗体を投与し、次いで、抗膜HSP70キメラ抗原受容体を発現する免疫細胞を投与することを含む、HSP70過剰発現細胞関連疾患を処置するための治療的組み合わせを包含する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明による操作された免疫細胞の概略図。この図に提示された操作された免疫細胞は、HSP70-scCARをコードするレトロウイルスベクターによって形質導入されたT細胞である。このT細胞は、本発明の範囲内で任意である、患者へのより良好でより安全な生着を可能にするため、さらに操作された。X遺伝子は、例えば、TCRの成分（TCR またはTCR $\alpha$ ）を発現する遺伝子であり得、Yは、（Campathに関して）CD52または（6-チオグアニンに関して）HPRTのような免疫抑制薬に対するT細胞の感受性に関与する遺伝子であり得る。

10

【図2】以下の表1に提示される成分を含む本発明の異なるscCAR構成（V1～V6）（抗HSP70 scCAR）の概略図。

【図3A】CAR陽性細胞注射に関連した可能性のある副作用を軽減するために設計された、T細胞枯渇のための、例えば、CD20ミモトープを使用したmAbエピトープタギングに基づく異なる戦略の概略図。V1およびv2は、それぞれ、VH鎖またはVL鎖のいずれか、TMは膜貫通ドメイン、Lはリンカーを表す。（A）細胞の選別または枯渇のためのエピトープタギング配列を含まない、本発明による多鎖構成の細胞外抗Hsp70リガンド結合ドメイン部分：V1：抗Hsp70モノクローナル抗体VH；L：GSリンカー；V2：抗Hsp70モノクローナル抗体VH；ヒンジ：好ましくはCD8ヒンジ；TM：好ましくはFc RI -TM-IC。（B）CARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入された少なくとも1個のエピトープを含む、本発明による多鎖構成の細胞外抗Hsp70ドメイン。エピトープはVH鎖とVL鎖との間に挿入されており；エピトープには異なるリンカーが接している。（C）ここに提示された構成は、いずれも、2個のエピトープがCARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入されている例に相当する。1個は、CARのN末端とVH鎖との間に挿入されており、エピトープには少なくとも1個または2個のリンカーが接しており；第2のエピトープは、VH鎖とVL鎖との間に挿入されており、第2のエピトープにも少なくとも1個または2個のリンカーが接している。ここに例示された構成は、第2のエピトープに接して使用されているリンカーによって異なっている。（D）ここに提示された構成は、いずれも、2個のエピトープがCARの細胞外リガンド結合ドメインに挿入されている例に相当する。1個はVH鎖とVL鎖との間に挿入されており；他方のエピトープは、VL鎖とヒンジとの間に挿入されており、各エピトープにも少なくとも1個または2個のリンカーが接している。ここに例示された構成は、第1のエピトープに接して使用されているリンカーによって異なっている。（E）2個のエピトープがCARの細胞外ドメインに挿入されている一つの構成が提示される。1個は、CARのN末端とVH鎖との間に挿入されており、エピトープには少なくとも1個または2個のリンカーが接しており；第2のエピトープは、VL鎖とヒンジとの間に挿入されており、第2のエピトープにもそのようなリンカーが接している。

20

30

40

【図3B】CAR陽性細胞注射に関連した可能性のある副作用を軽減するために設計された、T細胞枯渇のための、例えば、CD20ミモトープを使用したmAbエピトープタギングに基づく異なる戦略の概略図。V1およびv2は、それぞれ、VH鎖またはVL鎖のいずれか、TMは膜貫通ドメイン、Lはリンカーを表す。（F）ここに提示された構成は、いずれも、3個のエピトープがCARの細胞外ドメインに挿入されている例に相当する。1個は、CARのN末端とVH鎖との間に挿入されており、エピトープには少なくとも1個または2個のリンカーが接しており；第2のエピトープは、VH鎖とVL鎖との間に挿入されており、該エピトープにもそのようなリンカーが接しており、第3のエピトープは、VL鎖とヒンジとの間に挿入されている。これらの2つの構成は、第2のエピトープに接して使用されているリンカーによって異な

50

っている。(G)少なくとも2個のエピトープ(好ましくはCD20エピトープ)が細胞外リガンド結合ドメインのヒンジと抗CLL1のVH鎖およびVL鎖との間に挿入されている、本発明による多鎖構成の細胞外抗Hsp70ドメイン。第3の例示的な構成においては、1個のCD34エピトープが2個のCD20エピトープの間に含まれている。他の上記のCD20エピトープがCD34に交換されたさらなる構成が考慮され得る。(H)少なくとも2個のエピトープが細胞外リガンド結合ドメインの端に挿入されている、本発明による多鎖構成の細胞外抗Hsp70ドメイン。

【発明を実施するための形態】

【0022】

(表1)異なるscCAR成分の配列

機能ドメイン	SEQ ID #	生アミノ酸配列
CD8 $\alpha$ シグナルペプチド	SEQ ID NO.1	MALPVTALLPLALLHAARP
代替シグナル ペプチド	SEQ ID NO.2	METDTLLWVLLWVPGSTG
Fc $\epsilon$ R1II $\alpha$ ヒンジ	SEQ ID NO.3	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8 $\alpha$ ヒンジ	SEQ ID NO.4	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IgG1 ヒンジ	SEQ ID NO.5	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD8 $\alpha$ 膜貫通ドメイン	SEQ ID NO.6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
41BB 膜貫通ドメイン	SEQ ID NO.7	IISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVV
41BB 細胞内ドメイン	SEQ ID NO.8	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL
CD3 $\zeta$ 細胞内ドメイン	SEQ ID NO.9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
リンカー	SEQ ID NO.10	GGGGSGGGSGGGGS

【0023】

(表2)例示的なマウス抗HSP70およびヒト化抗HSP70のVH鎖およびVL鎖の可変領域ならびにそれぞれのCDRの配列

10

20

30

40

<b>ScFv 配列</b> マウス cmHsp70.1 重鎖可変領域	<b>SEQ ID #</b> SEQ ID NO.11	<b>生アミノ酸配列</b> EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLE WLGMIWGGGSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTD AMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS
ヒト化 cmHsp70.1 重鎖可変領域	SEQ ID NO.12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKG LEWLGMIWGGGSTDYNSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS
CDR1	SEQ ID NO.13	GFSLSRNSVH
CDR2	SEQ ID NO.14	WLGMIWGGGSTDYNSALKS
CDR3	SEQ ID NO.15	NGGYDVFHY
マウス cmHsp70.1 軽鎖可変領域	SEQ ID NO.16	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLF TGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWY SNHLVFGGGTKLTVLG
ヒト化 cmHsp70.1 軽鎖可変領域	SEQ ID NO.17	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQA PRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCAL WYSNHLVFGGGTKLTVLG
CDR1	SEQ ID NO.18	RSSTGAVTTSNYANWV
CDR2	SEQ ID NO.19	GLIGGTNNRAP
CDR3	SEQ ID NO.20	ALWYSNHLV

10

20

## 【 0 0 2 4 】

( 表 3 ) 構造V-1のscCAR

30

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-1	シグナル ペプチド	VH	VL	FcεRIIIα ヒンジ	CD8α TM	41BB -IC	CD3ζ CD
V1 マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.21)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V1 ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.27)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

40

## 【 0 0 2 5 】

( 表 4 ) 構造V-2のscCAR

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-2	シグナル ペプチド	VH	VL	FcεRIIIα ヒンジ	41BB- TM	41BB - IC	CD3ζ CD
V2-マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.22)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V2-ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.28)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

10

【 0 0 2 6 】

( 表 5 ) 構造V-3のscCAR

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-3	シグナル ペプチド	VH	VL	CD8α ヒンジ	CD8α TM	41BB -IC	CD3ζ CD
V3-マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.23)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V3-ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.29)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

20

【 0 0 2 7 】

( 表 6 ) 構造V-4のscCAR

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-4	シグナル ペプチド	VH	VL	CD8α ヒンジ	41BB- TM	41BB - IC	CD3ζCD
V4-マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.24)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V4-ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.30)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

30

【 0 0 2 8 】

( 表 7 ) 構造V-5のscCAR

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-5	シグナル ペプチド	VH	VL	IgG1 ヒンジ	CD8α TM	41BB - IC	CD3ζCD
V5-マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.25)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V5-ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.31)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

40

50

## 【 0 0 2 9 】

(表 8) 構造V-6のscCAR

scCAR 表記	scCAR 構造						
V-6	シグナル ペプチド	VH	VL	IgG1 ヒンジ	41BB- TM	41BB -IC	CD3ζ CD
V6-マウス cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.26)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
V6-ヒト化 cmHsp70.1 scCAR (SEQ ID NO.33)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

10

## 【 0 0 3 0 】

## 発明の詳細な説明

本明細書において特に定義されない限り、使用される技術用語および科学用語は、全て、遺伝子治療、生化学、遺伝学、および分子生物学の領域の当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。

## 【 0 0 3 1 】

適した方法および材料が本明細書に記載されるが、本明細書に記載されたものに類似しているかまたは等価である全ての方法および材料が、本発明の実施または試行において使用され得る。本明細書において言及された刊行物、特許出願、特許、およびその他の参照は、全て、参照によってその全体が組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されるであろう。さらに、材料、方法、および実施例は、他に特記されない限り、例示的なものに過ぎず、限定するためのものではない。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明の実施は、他に示されない限り、当技術分野の技術の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を利用するであろう。そのような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology(Frederick M.AUSUBEL,2000,Wiley and son Inc,Library of Congress,USA) ; Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Thir d Edition,(Sambrook et al,2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press) ; Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait ed.,1984) ; Mullisら、米国特許第4,683,195号 ; Nucleic Acid Hybridization(B.D.Harries & S.J.Higgins eds.1984) ; Transcription And Translation(B.D.Hames & S.J.Higgins eds.1984) ; Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987) ; Immobilized Cells And Enzymes(IR L Press,1986) ; B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the series, Methods In ENZYMOLOGY(J.Abelson and M.Simon,eds.-in-chief,Academic Press,Inc.,New York)、特に、第154巻および第155巻(Wu et al.eds.)および第185巻、「Gene Expression Technology」(D.Goeddel,ed.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller and M.P.Calos eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory) ; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London,1987) ; Handbook Of Experimental Immunology,Volumes I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell ,eds.,1986) ; ならびにManipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)を参照されたい。

30

40

## 【 0 0 3 3 】

本発明は、以下の態様を提供する。

1 .

HSP70に特異的な細胞外リガンド結合ドメイン、  
膜貫通ドメイン、および

50

細胞質シグナリングドメイン

を少なくとも含む、熱ショックタンパク質70 (hHSP70) 特異的キメラ抗原受容体 (抗HSP70 CAR)。

2 .

HSP70に特異的な細胞外リガンド結合ドメイン、

膜貫通ドメイン、および

細胞質シグナリングドメイン

を少なくとも含み、ただし「変異HSP70-2」抗原には結合しない、HSP70特異的キメラ抗原受容体 (抗HSP70 CAR)。

3 .

ヒト膜HSP70抗原 (mHSP70-1抗原) に結合する、態様1記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体 (CAR)。

4 .

ヒトmHSP70-1抗原に結合する、態様1または態様2記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体 (CAR)。

5 .

共刺激ドメインをさらに含む、態様1~3のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

6 .

CD28および/または4-1BBの共刺激ドメインをさらに含む、態様1記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

7 .

膜貫通ドメインがCD8 膜貫通ドメインを含む、態様1~3のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

8 .

ヒンジをさらに含む、態様1~4のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

9 .

細胞質シグナリングドメインがT細胞活性化ドメインを含む、態様1~4のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

10 .

単一ポリペプチドの形態で発現される、態様1~6のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

11 .

細胞外リガンド結合ドメインが、モノクローナル抗HSP70抗体に由来するドメインを含む、態様1~7のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

12 .

細胞外リガンド結合ドメインが、少なくとも1種のモノクローナル抗HSP70抗体のVHドメインおよびVLドメインに由来する相補性決定領域 (CDR) を含む、態様8記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

13 .

CDRがSEQ ID NO : 13~15および18~20より選択される、態様9記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

14 .

図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、

該構造が、モノクローナル抗HSP70抗体に由来するVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む、

態様1~10のいずれか一つに記載のHSP70特異的scCAR。

10

20

30

40

50



15 .

構造V1がFc RIII ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、態様1～11のいずれか一つに記載のHSP70特異的scCAR。

16 .

構造V3がCD8 ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、態様1～11のいずれか一つに記載のHSP70特異的scCAR。

17 .

構造V5がIgG1ヒンジおよびCD8 膜貫通ドメインを含む、態様1～11のいずれか一つに記載のHSP70特異的scCAR。

18 .

VHおよびVLが、SEQ ID NO : 11～12およびSEQ ID NO : 16～17より選択されるポリペプチド配列と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～14のいずれか一つに記載のHSP70特異的scCAR。

19 .

4-1BB由来の共刺激ドメインがSEQ ID NO : 8と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～15のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

20 .

CD3 シグナリングドメインがSEQ ID NO : 9と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～16のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

21 .

Fc RIII ヒンジがSEQ ID NO : 3と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～12または15～17のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

22 .

CD8 ヒンジがSEQ ID NO : 4と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～11、13、または15～17のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

23 .

IgG1ヒンジがSEQ ID NO : 5と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～11または14～19のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

24 .

CD8 膜貫通ドメインがSEQ ID NO : 6と少なくとも80%の同一性を有する、態様1～20のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

25 .

HSP70に特異的ではない別の細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む、態様1～21のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

26 .

SEQ ID NO : 23または29と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、態様1～12または態様15～17または態様21～22のいずれか一つに記載の構造V3のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

27 .

SEQ ID NO : 21または27と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、態様1～11、13、15～17、または態様21～22のいずれか一つに記載の構造V1のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

28 .

SEQ ID NO : 25または31と少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド配列を含む、態様1～11または態様14～19または態様21～22のいずれか一つに記載の構造V5のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

29 .

シグナルペプチドをさらに含む、態様1～25のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

30 .

10

20

30

40

50

シグナルペプチドがSEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2と少なくとも80%の配列同一性を有する、態様26記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

3 1 .

細胞外結合ドメインが1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のmAb特異的エピトープを含む、態様1~30のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

3 2 .

細胞外結合ドメインが1個、2個、3個、または4個のmAb特異的エピトープを含む、態様1~31のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

3 3 .

細胞外結合ドメインが2個、3個、または4個のmAb特異的エピトープを含む、態様1~32のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

3 4 .

細胞外結合ドメインが以下の配列を含む、態様1~33のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体：

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2$ ；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2$ ；

エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2$ ；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ4-( $L$ )<sub>x</sub>-；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ4-( $L$ )<sub>x</sub>-；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ4-( $L$ )<sub>x</sub>；

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2$ ；または

( $L$ )<sub>x</sub>-エピトープ1-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_1-(L)_x$ -エピトープ2-( $L$ )<sub>x</sub>- $V_2-(L)_x$ -エピトープ3-( $L$ )<sub>x</sub>

式中、

$V_1$ は $V_L$ でありかつ $V_2$ は $V_H$ であるか、または $V_1$ は $V_H$ でありかつ $V_2$ は $V_L$ であり、

$L_1$ は、 $V_H$ 鎖を $V_L$ 鎖へ連結するのに適したリンカーであり、

$L$ は、グリシン残基およびセリン残基を含むリンカーであり、細胞外結合ドメイン内の $L$ の存在は各々、同一の細胞外結合ドメイン内の他の $L$ の存在と同一であってもよくまたは異なってもよく、かつ

$x$ は0または1であり、 $x$ の存在は各々、他のものとは独立に選択され、かつ

エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、mAb特異的エピトープであり、同一であってもよくまたは異なってもよい。

3 5 .

細胞外結合ドメインが以下の配列を含む、態様34記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体：

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1； $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L； $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2； $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L； $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3； $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L； $V_1-L_1$

10

20

30

40

50

-V<sub>2</sub>-エピトープ1; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-エピトープ1-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-エピトープ1-L-エピトープ2; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-エピトープ1-L-エピトープ2-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L; エピトープ1-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; エピトープ1-L-エピトープ2-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; エピトープ1-L-エピトープ2-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-エピトープ2-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; V<sub>1</sub>-L-エピトープ1-L-V<sub>2</sub>; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L-エピトープ2-L-V<sub>2</sub>; V<sub>1</sub>-L-エピトープ1-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L; V<sub>1</sub>-L-エピトープ1-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L-エピトープ3; V<sub>1</sub>-L-エピトープ1-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-エピトープ3; V<sub>1</sub>-L-エピトープ1-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L-エピトープ2-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ3-L; エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L-エピトープ2-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ3-L; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L-エピトープ2-L-V<sub>2</sub>-L-エピトープ3; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L-エピトープ3; L-エピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-エピトープ3; またはエピトープ1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4

10

式中、

V<sub>1</sub>はV<sub>L</sub>でありかつV<sub>2</sub>はV<sub>H</sub>であるか、またはV<sub>1</sub>はV<sub>H</sub>でありかつV<sub>2</sub>はV<sub>L</sub>であり、

L<sub>1</sub>は、V<sub>H</sub>鎖をV<sub>L</sub>鎖へ連結するのに適した任意のリンカーであり、

20

Lは、グリシン残基およびセリン残基を含むリンカーであり、細胞外結合ドメイン内のLの存在は各々、同一の細胞外結合ドメイン内の他のLの存在と同一であってもよくまたは異なってもよく、かつ

エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、mAb特異的エピトープであり、同一であってもよくまたは異なってもよい。

36.

L<sub>1</sub>がグリシンおよび/またはセリンを含むリンカーである、態様34または35記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

37.

L<sub>1</sub>がアミノ酸配列(Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>または(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>を含むリンカーであり、式中、nが1、2、3、4、または5である、態様33記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

30

38.

L<sub>1</sub>がアミノ酸配列(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>または(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>を含むリンカーである、態様34~37のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

39.

Lが、

SGG, GGS, SGGG, SSGG, GGGG,

SGGGG, GGGGS, SGGGG, GGGGG, SGGGGG, GSGGGG, GGGGGG,

40

SGGGGGG, SGGGGGGG,またはSGGGGGGGG

より選択されるアミノ酸配列を有するリンカーである、態様38記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

40.

Lが、SGGGG、GGGGS、またはSGGGGである、態様39記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

41.

エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4が、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ-CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、プレントキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ

50

、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、QBEND-10、アレムツズマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるmAb特異的エピトープより独立に選択される、態様31～38のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

4 2 .

エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4が、SEQ ID NO : 33～SEQ ID NO : 42のいずれか1つのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープより独立に選択される、態様31～41のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

10

4 3 .

エピトープ1がSEQ ID NO : 33のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、態様31～42のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

4 4 .

エピトープ2がSEQ ID NO : 33またはSEQ ID NO : 35～38のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、態様31～43のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

4 5 .

エピトープ3がSEQ ID NO : 33またはSEQ ID NO : 35～38のいずれか1つのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、態様31～44のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

20

4 6 .

エピトープ4がSEQ ID NO : 41または42のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである、態様31～45のいずれか一つに記載のHSP70特異的キメラ抗原受容体。

4 7 .

態様1～46のいずれか一つに記載のキメラ抗原受容体をコードする、ポリヌクレオチド。

4 8 .

態様47記載の核酸を含む、発現ベクター。

4 9 .

態様1～46のいずれか一つに記載の抗HSP70 CARを細胞表面膜に発現する、操作されたリンパ系免疫細胞。

30

5 0 .

炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、またはヘルパーTリンパ球に由来する、態様49記載の操作されたリンパ系免疫細胞。

5 1 .

治療において使用するための態様49または50に記載の操作された細胞。

5 2 .

患者がヒトである、治療において使用するための態様49～51のいずれか一つに記載の操作された細胞。

40

5 3 .

状態が、HSP70発現細胞を特徴とする前悪性または悪性のがん状態である、治療において使用するための態様49～52のいずれか一つに記載の操作された細胞。

5 4 .

状態が、HSP70発現細胞の過多を特徴とする状態である、治療において使用するための態様49～53のいずれか一つに記載の操作された細胞。

5 5 .

状態が血液がん状態である、治療において使用するための態様49～54のいずれか一つに記載の操作された細胞。

5 6 .

50

血液がん状態が白血病である、治療において使用するための態様49~55のいずれか一つに記載の操作された細胞。

57.

白血病が急性骨髄性白血病(AML)である、治療において使用するための態様49~55のいずれか一つに記載の操作された細胞。

58.

前記免疫細胞においてTCRの発現が抑制されている、態様49~57のいずれか一つに記載の操作された細胞。

59.

前記免疫細胞において少なくとも1種のMHCタンパク質、好ましくは 2mまたはHLAの発現が、阻止または抑制されている、態様49~58のいずれか一つに記載の操作された細胞。

60.

少なくとも1種の免疫抑制薬または化学療法薬に対する耐性を付与するために変異させた、態様49~59のいずれか一つに記載の操作された細胞。

61.

Hsp70.1過剰発現細胞に関連した疾患を処置する方法において使用するための、少なくとも、態様1~46のいずれか一つに記載の抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞(例えば、T細胞)と、可溶性Hsp70に対する抗体との組み合わせ。

62.

可溶性Hsp70に対する抗体が、該抗体の投与前と比較して患者の血漿中の可溶性Hsp70のレベルが少なくとも50%、好ましくは75%、より好ましくは90%低下するまで、最初に投与され、

該可溶性Hsp70特異的モノクローナル抗体の投与の後に、抗mHsp70 CAR発現免疫細胞が投与される、

患者へ連続的に投与される態様61記載の組み合わせ。

63.

血液がん細胞の障害を引き起こすのに有効な量の態様49~60のいずれか一つに記載の操作された細胞と血液がん細胞を接触させる工程を含む、血液がん細胞に障害を与える方法。

64.

少なくとも、態様1~46のいずれか一つに記載の抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞(例えば、T細胞)と、薬物との組み合わせ。

65.

(a) 免疫細胞を準備する工程、

(b) 態様1~46のいずれか一つに記載の少なくとも1種のHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を該細胞の表面に発現させる工程を含む、免疫細胞を操作する方法。

66.

(a) 免疫細胞を準備する工程、

(b) HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを該細胞へ導入する工程、

(c) ポリヌクレオチドを該細胞において発現させる工程を含む、態様65記載の免疫細胞を操作する方法。

67.

(a) 免疫細胞を準備する工程、

(b) 抗HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを該細胞へ導入する工程、

(c) HSP70に特異的ではない少なくとも1種の他のキメラ抗原受容体を導入する工程を含む、態様66記載の免疫細胞を操作する方法。

68.

10

20

30

40

50

(a) 態様1~46のいずれか一つに記載の抗HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を表面に発現する免疫細胞を準備する工程、

(b) 該免疫細胞を患者へ投与する工程  
を含む、その必要のある対象を処置する方法。

69 .

前記免疫細胞がドナーから提供される、態様68記載の方法。

70 .

前記免疫細胞が患者自身から提供される、態様68記載の方法。

71 .

エピトープに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体が、必要な場合に患者へ投与される、態様31~46のいずれか一つに記載のHSP70特異的CARおよび少なくとも1種のエピトープを発現する操作されたリンパ系免疫細胞を患者において枯渇させるための方法。

10

【0034】

HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体

本発明は、HSP70抗原の一部に対して特異的な細胞外リガンド結合ドメインと、膜貫通ドメインと、シグナリング伝達ドメインとを含むHSP70特異的キメラ抗原受容体に関する。

【0035】

キメラ抗原受容体(CAR)とは、活性化シグナルまたは阻害シグナルを細胞免疫活性に向けて伝達するであろうキメラタンパク質を生成するため、標的細胞上に存在する成分に対する細胞外結合ドメイン、例えば、所望の抗原(例えば、腫瘍抗原)に対する抗体に基づく特異性を、免疫細胞受容体成分と組み合わせた分子を表す。

20

【0036】

本発明は、より具体的には、  
細胞外リガンド結合ドメイン抗HSP70、  
膜貫通ドメイン、および  
細胞質シグナリングドメイン

を少なくとも含む、HSP70特異的キメラ抗原受容体(抗HSP70 CAR)に関し、ただし抗HSP70 CARは変異HSP70-2抗原には結合しない。

【0037】

本願の全体にわたって使用される「抗HSP70キメラ受容体」とは、ヒト変異Hsp70-2抗原に結合しないことを条件として任意のヒトHSP70抗原に結合することができる全てのキメラ抗原受容体(CAR)を意味する。

30

【0038】

本発明の抗HSP70 CARによって結合されない「変異Hsp70-2」(または変異HSP72)抗原とは、8位のアミノ酸残基がイソロイシンからアスパラギン酸へ変異している(Gaudin C et al,1999)または564位のアミノ酸残基がリジンからアラニンへ変異している(Jakobson ME et al.2013)、UniprotリファレンスP54652のポリペプチドを意味する。

【0039】

本発明は、ヒトHsp70.1抗原、非変異型のHsp70-2抗原、Hsp70-3抗原、Hsp70-4抗原、Hsp70-6抗原、Hsp70-7抗原、Hsp70-8抗原、Hsp70-9抗原、Hsp70-13抗原、またはHsp70-14抗原に結合することができる抗HSP70 CARを包含する。ヒトにおけるこれらのアイソフォームは、全て、Daugaard M et al.(2007)またはKabani M et al.(2008)に記載されている。

40

【0040】

好ましい態様によると、本発明の抗HSP70 CARは、ヒト膜HSP70-1熱ショック抗原(別名HSP70.1、HSPA1A、またはHSX70、HSPA1A遺伝子によってコードされるタンパク質)に結合する。

【0041】

以後、「Hsp70」という用語は、より具体的には、分泌型のHsp70である細胞外Hsp70(e Hsp70)と区別される膜Hsp70(mHsp70)を意味する(Pockley AG et al.1998)。

50

## 【0042】

好ましくは本発明によるHSP70特異的キメラ抗原受容体は、例えば、Jena, B., G. Dotti, et al. (2010)に記載されるような、共刺激ドメイン、好ましくはCD28または4-1BBの共刺激ドメイン、より好ましくは4-1BBの共刺激ドメインをさらに含む。それは、CD8 膜貫通ドメインであり得る膜貫通ドメインを含んでいてもよく、任意で、ヒンジを含んでいてもよい。

## 【0043】

本発明によるCARのシグナル伝達ドメインまたは「細胞質シグナリングドメイン」は、細胞外リガンド結合ドメインの標的への結合の後の細胞内シグナリングを担い、免疫細胞の活性化または阻害および免疫応答をもたらす。換言すると、シグナル伝達ドメインは、CARが発現される免疫細胞の正常なエフェクター機能のうちの少なくとも一つの活性化または不活化を担う。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。従って、「細胞質シグナリングドメイン」という用語は、エフェクターシグナル機能シグナルを伝達し、専門の機能を果たすよう細胞に指図するタンパク質の部分をさす。

## 【0044】

好ましくは、シグナル伝達経路に関与するヒトタンパク質に由来する細胞質シグナリングドメインは、シグナリングの性質に依って、抗HSP70 CARが、陽性CAR (PCAR) であるかそれとも陰性CAR (NCAR) であるかを決定する。それぞれ、細胞外リガンド結合ドメインがHSP70に結合した時に、ヒトTCR受容体に由来するCD3 のようなシグナリングドメインが、免疫細胞の細胞免疫活性を刺激する効果を有する時、そのCARはPCARである。反対に、シグナリングドメインが、ヒト免疫阻害受容体CTLA-4およびPD-1のシグナリングドメインのように、細胞免疫活性を低下させる効果を有する時、その抗HSP70 CARはNCARまたは阻害性CAR (iCAR) である (Federov et al., Sci Transl Med. 2013 Dec 11; 5(215): 215ra172)。抗HSP70 CARにおいて使用するためのシグナル伝達ドメインの好ましい例は、抗原受容体会合の後にシグナル伝達を開始するために協調的に作用するT細胞受容体およびコレセプターの細胞質配列、ならびに同一の機能的能力を有するこれらの配列の誘導体またはバリエーションおよび合成配列であり得る。シグナル伝達ドメインには、細胞質シグナリング配列の2種の別個のクラス (抗原依存性の一次活性化を開始するもの、および二次的または共刺激的なシグナルを提供するために抗原非依存的に作用するもの) が含まれる。一次細胞質シグナリング配列には、ITAMの免疫受容体活性化チロシンモチーフとして公知であるシグナリングモチーフが含まれ得る。ITAMは、syk/zap70クラスチロシンキナーゼのための結合部位として役立つ、多様な受容体の細胞質内テールに見出される十分に定義されたシグナリングモチーフである。本発明において使用されるITAMの例には、非限定的な例として、TCR、FcR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれ得る。好ましい態様において、抗HSP70 CARのシグナリング伝達ドメインには、SEQ ID NO: 9からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、95%、97%、または99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するCD3 シグナリングドメインが含まれ得る。

## 【0045】

特定の態様において、本発明の抗HSP70 CARのシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル分子を含む。共刺激分子とは、効率的な免疫応答のために必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。「共刺激リガンド」とは、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、それによって、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子とのTCR/CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖活性化、分化等を含むが、これらに限定されるわけではないT細胞応答を媒介するシグナルを提供する抗原提示細胞上の分子をさす。共刺激リガンドには、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド (ICOS-L)、細胞間接着分子 (ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、リンホトキシン 受容体、3/TR

10

20

30

40

50

6、ILT3、ILT4、トールリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、およびB7-H3に特異的に結合するリガンドが含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。共刺激リガンドには、とりわけ、以下に限定されるわけではないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1 (LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンドのような、T細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体も包含される。「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合し、それによって、これに限定されるわけではないが、増殖のような、細胞による共刺激応答を媒介するT細胞上の同族結合パートナーをさす。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLA、およびトールリガンド受容体が含まれるが、これらに限定されるわけではない。共刺激分子の例には、CD27、CD28、CD8、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83に特異的に結合するリガンド等が含まれる。

10

#### 【0046】

好ましい態様において、本発明の抗HSP70 CARのシグナル伝達ドメインは、4-1BB (GenBank : AAA53133) およびCD28 (NP\_006130.1) の断片からなる群より選択される共刺激シグナル分子の一部を含む。具体的には、本発明の抗HSP70 CARのシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:8からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、95%、97%、または99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む。

#### 【0047】

20

本発明による抗HSP70 CARは概して、膜貫通ドメイン(TM)をさらに含む。適切な膜貫通ドメインの特徴的な特色は、細胞、本発明において好ましくは、免疫細胞、具体的には、リンパ球またはナチュラルキラー(NK)細胞の表面において発現され、予め定義された標的細胞に対する免疫細胞の細胞応答を指図するために共に相互作用する能力を含む。膜貫通ドメインは、天然起源に由来してもよく、または合成起源に由来してもよい。膜貫通ドメインは、膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。非限定的な例として、膜貫通ポリペプチドは、  
、  
、  
、もしくは  
のようなT細胞受容体のサブユニット、CD3複合体を構成するポリペプチド、IL2受容体のp55(鎖)、p75(鎖)、もしくは鎖、Fc受容体、具体的には、Fc受容体IIIのサブユニット鎖、またはCDタンパク質であり得る。あるいは、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、ロイシンおよびバリンのような疎水性残基を主に含んでいてもよい。好ましい態様において、膜貫通ドメインは、ヒトCD8鎖(例えば、NP\_001139345.1)に由来する。膜貫通ドメインは、さらに、細胞外リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域を含んでいてもよい。本明細書において使用される「ヒンジ領域」という用語は概ね、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するよう機能するオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。具体的には、ヒンジ領域は、細胞外リガンド結合ドメインのために、より高い可動性および接近可能性を提供するために使用される。ヒンジ領域は、300個までのアミノ酸、好ましくは、10~100個のアミノ酸、最も好ましくは、25~50個のアミノ酸を含み得る。ヒンジ領域は、CD8、CD4、もしくはCD28の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部のような、天然に存在する分子の全部または一部に由来し得る。あるいは、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジ配列に相当する合成配列であってもよく、または完全に合成のヒンジ配列であってもよい。好ましい態様において、ヒンジ領域は、本明細書においてSEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、およびSEQ ID NO:5とそれぞれ呼ばれるヒトCD8鎖、FcRIII受容体、もしくはIgG1の一部、またはこれらのポリペプチドとの好ましくは少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、95%、97%、もしくは99%の配列同一性を示すヒンジポリペプチドを含む。

30

40

#### 【0048】

好ましい態様によると、本発明による抗HSP70 CARは、より具体的には、SEQ ID NO:6または7のポリペプチドとの同一性を示すCD8および4-1BBより選択される膜貫通ドメインを含む。

50



## 【0049】

本発明による抗HSP70 CARは概して、膜貫通ドメイン(TM)、より具体的には、CD8 および4-1BBより選択されるTM、さらに具体的には、SEQ ID NO:6または7のポリペプチドとの同一性を示すものをさらに含む。

## 【0050】

好ましい態様において、本発明による抗HSP70 CARは、SEQ ID NO:6を有するか、またはSEQ ID NO:6と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すCD8 由来のTMドメインをさらに含む。

## 【0051】

がん細胞においては、抗原損失エスケープバリエーションを生成する、標的抗原のダウンレギュレーションまたは変異が、概ね観察される。従って、腫瘍エスケープを埋め合わせ、免疫細胞を標的に対してより特異的にするため、本発明による特異的抗HSP70 CARは、標的内の異なる要素に同時に結合し、それによって、免疫細胞の活性化および機能を強化するための、別の細胞外リガンド結合ドメインを含んでいてもよい。一つの態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、同一の膜貫通ポリペプチド上にタンデムに置かれてもよく、任意で、リンカーによって隔てられてもよい。別の態様において、異なる細胞外リガンド結合ドメインは、抗HSP70 CARを構成する異なる膜貫通ポリペプチド上に置かれてもよい。別の態様において、本発明は、各々異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む抗HSP70 CARの集団に関する。具体的には、本発明は、免疫細胞を準備する工程、および各々異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む抗HSP70 CARの集団を細胞の表面に発現させる工程を含む、免疫細胞を操作する方法に関する。別の具体的な態様において、本発明は、免疫細胞を準備する工程、および各々異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む抗HSP70 CARの集団を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞へ導入する工程を含む、免疫細胞を操作する方法に関する。抗HSP70 CARの集団とは、各々異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む、少なくとも2種、3種、4種、5種、6種、またはそれ以上の抗HSP70 CARを意味する。本発明による異なる細胞外リガンド結合ドメインは、好ましくは、標的内の異なる要素に同時に結合し、それによって、免疫細胞の活性化および機能を強化することができる。本発明は、各々異なる細胞外リガンド結合ドメインを含む抗HSP70 CARの集団を含む単離された免疫細胞にも関する。

## 【0052】

本発明によるHSP70特異的キメラ抗原受容体は、例えば、単鎖キメラタンパク質(scCAR)として発現させられてもよく、または少なくとも1個のそのようなキメラタンパク質を含むいくつかのポリペプチド(多鎖)の形態で発現させられてもよい。異なる構成を有し得る。そのような多鎖CAR構成は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2014/039523、具体的には、図2~4および14~21頁に開示されている。

## 【0053】

抗HSP70 CARは概して、T細胞において発現させられた時に、モノクローナル抗体の特異性に基づき、抗原認識を向け直す能力を有する、T細胞抗原受容体複合体 鎖の細胞内シグナリングドメインに融合した細胞外単鎖抗体(scFv Fc)(scFv Fc: )を含む。

## 【0054】

本願は、非限定的な例として、アミノ酸配列:SEQ ID NO:21~32を含む、HSP70抗原に対するいくつかの抗HSP70単鎖CARを開示する。

## 【0055】

本発明のHSP70 CARは、上述のような「多鎖CAR」であってもよい。それは、細胞外結合ドメインおよびシグナリングドメインが、好ましくは、異なるポリペプチド鎖上に置かれる一方、共刺激ドメインは、同一のポリペプチド上に置かれていてもよくまたは第3のポリペプチド上に置かれていてもよいことを意味する。そのような多鎖CARは、Fc RI 鎖の高親和性IgE結合ドメインをscFvのような細胞外リガンド結合ドメインに交換することによって、Fc RIから導出され得(Ravetch et al,1989)、Fc RIの 鎖および/または鎖のN末端および/またはC末端のテールが、それぞれ、シグナル伝達ドメインおよび共

刺激ドメインに融合させられる。細胞外リガンド結合ドメインは、T細胞の特異性を細胞標的へ向け直す役割を有し、シグナル伝達ドメインは免疫細胞応答を活性化するかまたは低下させる。Fc RI由来のポリペプチド、ポリペプチド、およびポリペプチドに由来する異なるポリペプチドが膜近傍の位置にある膜貫通ポリペプチドであるという事実は、WO2014/039523に記載されるように、より可動性の構成をCARに提供して、標的分子に対する特異性を改善し、免疫細胞のバックグラウンド活性化を低下させる。

#### 【0056】

細胞外リガンド結合ドメイン

「細胞外リガンド結合ドメイン」という用語は、本明細書において使用されるように、リガンドと結合することができるオリゴペプチドまたはポリペプチドとして定義される。好ましくは、ドメインは、細胞表面分子と相互作用することができるであろう。例えば、細胞外リガンド結合ドメインは、特定の疾患状態に関連した標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するよう選択され得る。それは、例えば、リガンド、受容体、ヒトもしくはマウスの抗体に由来する結合ドメイン、またはラクダもしくは軟骨魚に由来する抗原認識ドメインであり得る。

#### 【0057】

好ましい態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、可動性リンカーによって接合された標的抗原特異的なモノクローナル抗HSP70抗体の軽鎖 ( $V_L$ ) および重鎖 ( $V_H$ ) の可変断片を含む単鎖抗体断片 (scFv) を含む。

#### 【0058】

$V_L$  および  $V_H$  は、好ましくは Zettlitz KA et al 2010 に開示された cmHsp70.1 抗体の scFv のような、文献中に言及された抗体より選択される。cmHsp70.1 抗体の標的は、HSPA1A (NP\_005336.3) 遺伝子によってコードされる熱ショック70kDaタンパク質1Aである。この発表によると、cmHsp70.1はヒト化された；マウス抗体およびヒト化抗体の両方が、mHsp70のC末端の基質結合ドメイン (SBD) のアミノ酸473~504を含む同一の領域を認識する。そのようなcmHsp70.1抗体は、「TKD」と呼ばれる14アミノ酸長ペプチドを認識する (Stangl S et al, 2011)。一つの態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、可動性リンカーによって接合された標的抗原特異的なモノクローナル抗HSP70抗体マウスcmHsp70.1の重鎖 ( $V_H$ ) および軽鎖 ( $V_L$ ) の可変断片を含む単鎖抗体断片 (scFv) を含み、該  $V_H$  および  $V_L$  の可変断片は、それぞれ、SEQ ID NO: 11および16と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは99%の同一性を有する。

#### 【0059】

好ましい態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、可動性リンカーによって接合された標的抗原特異的なモノクローナル抗HSP70抗体ヒト化cmHsp70.1の重鎖 ( $V_H$ ) および軽鎖 ( $V_L$ ) の可変断片を含む単鎖抗体断片 (scFv) を含み、該  $V_H$  および  $V_L$  の可変断片は、それぞれ、SEQ ID NO: 12および17と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%、さらに好ましくは99%の同一性を有する。

#### 【0060】

別の態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、下記のSEQ ID NO: 13~15より選択される、モノクローナル抗HSP70抗体、マウスcmHsp70.1およびヒト化cmHsp70.1の  $V_H$  ドメインおよび  $V_L$  ドメインに由来するCDRを含む。

#### 【0061】

好ましい態様によると、ヒト化モノクローナル抗HSP70 cmHsp70.1抗体由来の  $V_H$  鎖のCDR配列は、GFSLSRNSVH (SEQ ID NO 13), WLGMWGGGSTDYNSALKS (SEQ ID NO 14), または NGGYDVPHY (SEQ ID NO 15) の中から選択され得る。

#### 【0062】

好ましい態様によると、マウスまたはヒト化モノクローナルcmHsp70.1抗HSP70抗体由来の  $V_L$  鎖のCDR配列は、RSSTGAVTTSNYANWV (SEQ ID NO 18), GLIGGTNNRAP (SEQ ID NO 19), または ALWYSNHLV (SEQ ID NO 20)

の中から選択され得る。

【0063】

一つの態様において、 $V_L$ および $V_H$ は、好ましくは(2003年11月14日にDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany)に寄託され、アクセッション番号DSM ACC2629を割り当てられた)EP 2070947において言及された抗体、または(2003年11月14日にDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHに寄託され、アクセッション番号DSM ACC2630を割り当てられた)ハイブリドーマcmHsp70.2によって産生されるcmHsp70.2、またはWO2002022656のもの、またはJuhasz K. et al., Cancers 2014 6 42-66 doi 10.3390/cancers6010042に開示されたものより選択される。

10

【0064】

好ましい態様において、抗体はヒト化されている。

【0065】

別の態様において、細胞外リガンド結合ドメインは、EP2070947のもののようなモノクローナル抗HSP70マウスcmHsp70.1抗体およびヒト化cmHsp70.1抗体、または(2003年11月14日にDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany)に寄託され、アクセッション番号DSM ACC2629を割り当てられた)WO2002022656のもの、または(2003年11月14日にDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHに寄託され、アクセッション番号DSM ACC2630を割り当てられた)ハイブリドーマcmHsp70.2によって産生されるcmHsp70.2のVHドメインおよびVLドメインに由来するCDRを含む。

20

【0066】

細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインは、好ましくは、配列SEQ ID NO: 10を含む可動性リンカーによって共に連結される。

【0067】

「組換え抗体」という用語は、本明細書において使用されるように、例えば、バクテリオファージ、酵母発現系、または哺乳動物細胞発現系によって発現された抗体または抗体断片のような、組換えDNAテクノロジーを使用して生成された抗体または抗体断片を意味する。本用語は、抗体もしくは抗体断片をコードしかつ抗体もしくは抗体断片のタンパク質を発現するDNA分子の合成または抗体もしくは抗体断片を特定するアミノ酸配列の合成によって生成された、抗体もしくは抗体断片も意味するものと解釈されるべきであり、該DNAまたはアミノ酸配列は、当技術分野において入手可能であり周知であるDNAまたはアミノ酸配列の組換え技術または合成技術を使用して入手されるものである。

30

【0068】

本発明は、細胞外リガンド結合ドメインが、ヒト化されたVH鎖およびVL鎖を含む、前記のHSP70特異的単鎖キメラ抗原受容体、好ましくは単鎖CAR(抗HSP70 scCAR)を開示する。

【0069】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書において使用されるように、ポリペプチドがヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域を含むことを意味する。例えば、ポリペプチドは、親モノクローナル抗体の抗原結合特異性を実質的に保持しながら、ヒト抗体の軽鎖および重鎖の可変領域のフレームワーク(FR)領域を含んでいてよい。ヒト化重鎖可変領域および/またはヒト化軽鎖可変領域は、相補性決定領域(CDR)を除き、少なくとも約87%ヒト化されているか、少なくとも約90%ヒト化されているか、少なくとも約95%ヒト化されているか、少なくとも約98%ヒト化されているか、または少なくとも約100%ヒト化されている。抗原結合ポリペプチド分子は、モノクローナル抗体ドナー(例えば、マウスモノクローナル抗体ドナー)に由来してよく、モノクローナル抗体由来のCDR(例えば、マウスモノクローナルCDR)を含んでいてよい。

40

【0070】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用されるように、天然抗体

50

より多量で、均一であり、HSP70抗原上の単一の部位に特異的に結合することができる、ハイブリドーマまたはウイルスによって形質転換されたリンパ球のいずれかの実験室で培養された細胞クローンによって産生された抗体を意味する。それらは、数種の異なる免疫細胞から作製されるポリクローナル抗体とは対照的に、全てが独特の親細胞のクローンである同一の免疫細胞によって作製される単一特異性抗体である。モノクローナル抗体は、同一のエピトープに結合するため、1価の親和性を有する。ヒト化のために適用されている現在の方法論は、Lefranc MPら (Lefranc,MP,Ehrenmann F,Ginestoux C,Giudicelli V,Duroux P 「抗体の操作およびヒト化のためのIMGT (登録商標) データベースおよびツールの使用 (Use of IMGT (登録商標) databases and tools for antibody engineering and humanization) 」Methods Mol Biol.2012;907:3-37) による。これらには4種のアライメントが示されている。

10

#### 【0071】

ヒト化抗体は、CDRグラフティング (例えば、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられる、欧州特許番号EP 239,400; 国際公開番号WO 91/09967; ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、および第5,585,089号参照)、ベニヤリング (veneering) またはリサーフェイシング (resurfacing) (例えば、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられる、欧州特許番号EP 592,106およびEP 519,596; Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498; Studnicka et al.,1994,Protein Engineering,7(6):805-814; およびRoguska et al.,1994,PNAS,91:969-973参照)、チェーンシャuffling (chain shuffling) (例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第5,565,332号参照)、ならびに、例えば、各々参照によってその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開番号US2005/0042664、米国特許出願公開番号US2005/0048617、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開番号WO 9317105、Tan et al.,J.Immunol.,169:1119-25(2002)、Caldas et al.,Protein Eng.,13(5):353-60(2000)、Morea et al.,Methods,20(3):267-79(2000)、Baca et al.,J.Biol.Chem.,272(16):10678-84(1997)、Roguska et al.,Protein Eng.,9(10):895-904(1996)、Couto et al.,Cancer Res.,55(23 Supp):5973s-5977s(1995)、Couto et al.,Cancer Res.,55(8):1717-22(1995)、Sandhu J S,Gene,150(2):409-10(1994)、およびPedersen et al.,J.Mol.Biol.,235(3):959-73(1994)に開示された技術を含むが、これらに限定されるわけではない、当技術分野において公知の多様な技術を使用して作製され得る。しばしば、抗原結合を改変するため、例えば、改善するため、フレームワーク領域内のフレームワーク残基が、CDRドナー抗体由来の対応する残基に置換されるであろう。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法によって、例えば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワークの残基の相互作用のモデル化、ならびに特定の位置における稀なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって、同定される。(例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる、Queenらの米国特許第5,585,089号; およびRiechmann et al.,1988,Nature,332:323参照)。

20

30

#### 【0072】

保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似した側鎖を有するアミノ酸残基と交換されるものである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸が含まれる。従って、本発明の抗HSP70 CAR内の1個または複数個のアミノ酸残基を、同一側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と交換することができ、改変された抗HSP70 CARを、本明細書に記載された機能アッセイを使用して、HSP70に結合する能力について試験することができる。

40

50

## 【 0 0 7 3 】

## 抗HSP70単鎖CAR ( scCAR )

好ましい態様において、本発明は、図2および表3～8に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70特異的単鎖キメラ抗原受容体 ( 「抗HSP70 scCAR」または「scCAR」 ) を開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、膜貫通ドメインと、シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

## 【 0 0 7 4 】

より好ましい態様において、本発明は、構造V1、V3、またはV5が、Fc RIII 、CD8 、またはIgG1のヒンジ、およびCD8 膜貫通ドメインを含む、前記のHSP70特異的scCARを開示する。

10

## 【 0 0 7 5 】

別のより好ましい態様において、HSP70特異的scCARは、共刺激ドメイン4-1BBまたはCD28、より好ましくは、4-1BB共刺激ドメインを含む。

## 【 0 0 7 6 】

本発明は、構造V1、V3、またはV5がそれぞれ、Fc RIII 、CD8 、またはIgG1のヒンジ、および4-1BB膜貫通ドメインを含む、前記のHSP70特異的scCARを開示する。

## 【 0 0 7 7 】

本発明は、構造V1、V3、またはV5がそれぞれ、Fc RIII 、CD8 、またはIgG1、4-1BB細胞質ドメイン、およびCD8 膜貫通ドメインを含む、前記のHSP70特異的scCARを開示する。

20

## 【 0 0 7 8 】

好ましい態様によると、本発明の抗HSP70 scCARは、図2に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該CD3 シグナリングドメインは、好ましくは、配列SEQ ID NO : 9を有する。

## 【 0 0 7 9 】

別の好ましい態様によると、本発明の抗HSP70 scCARは、図2に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該4-1BB共刺激ドメインは、好ましくは、配列SEQ ID NO : 8を有する。

30

## 【 0 0 8 0 】

本発明は、図2に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、Fc RIII ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

40

## 【 0 0 8 1 】

本発明は、図2に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

## 【 0 0 8 2 】

本発明は、図2に例示されるV1～V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択

50

されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、IgG1ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

【0083】

本発明は、図2に例示されるV1~V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、Fc RIII ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 7を有する、4-1BB膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

10

【0084】

本発明は、図2に例示されるV1~V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 7を有する、4-1BB膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

【0085】

本発明は、図2に例示されるV1~V6、好ましくはV1、V3、およびV5バージョンより選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有する抗HSP70 scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、IgG1ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 7を有する、4-1BB膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

20

【0086】

具体的な局面において、本発明は、図2に例示されるV1ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 3を有する、Fc RIII ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO: 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

【0087】

30

より具体的には、本発明は、図2に例示されるV1ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 3を有する、Fc RIII ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO: 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖は、SEQ ID NO: 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VLは、SEQ ID NO: 16または17と少なくとも80%の同一性を有する。

【0088】

別の具体的な局面において、本発明は、図2に例示されるV3ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 4を有する、CD8 ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO: 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

40

【0089】

より具体的には、本発明は、図2に例示されるV3ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 4を有するCD8 ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 9を有す

50

る、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO : 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖は、SEQ ID NO : 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VL鎖は、SEQ ID NO : 16または17と少なくとも80%の同一性を有する。

【0090】

さらに別の具体的な局面において、本発明は、図2に例示されるV5ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 5を有する、IgG1ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO : 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

10

【0091】

より具体的には、本発明は、図2に例示されるV5ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 5を有する、IgG1ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO : 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖は、SEQ ID NO : 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VL鎖は、SEQ ID NO : 16または17と少なくとも80%の同一性を有する。

20

【0092】

本発明は、図2に例示されるV1ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該ポリペプチドは、SEQ ID NO : 21または27と少なくとも80%の同一性を有する。

【0093】

具体的には、図2に例示されるV1ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARであって、該構造が、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 3を有する、Fc RIII ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび、好ましくは、SEQ ID NO : 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖が、SEQ ID NO : 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VLが、SEQ ID NO : 16または17と少なくとも80%の同一性を有し、該ポリペプチドが、SEQ ID NO : 21または27と少なくとも80%の同一性を有するもの。

30

【0094】

本発明は、図2に例示される構造V3の抗HSP70特異的scCARを開示し、該ポリペプチドは、SEQ ID NO : 23または29と少なくとも80%の同一性を有する。

【0095】

より具体的には、本発明は、図2に例示されるV3ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 4を有する、CD8 ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO : 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO : 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO : 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖は、SEQ ID NO : 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VL鎖は、SEQ ID NO : 16または17と少なくとも80%の同一性を有し、該ポリペプチドは、SEQ ID NO : 23または29と少なくとも80%の同一性を有する。

40

【0096】

本発明は、図2に例示される構造V5の抗HSP70特異的scCARを開示し、該ポリペプチドは、SEQ ID NO : 25または31と少なくとも80%の同一性を有する。

【0097】

より具体的には、本発明は、図2に例示されるV5ポリペプチド構造を有する抗HSP70特異

50

的scCARを開示し、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 5を有する、IgG1ヒンジと、好ましくは、SEQ ID NO: 6を有する、CD8 膜貫通ドメインと、好ましくは、SEQ ID NO: 9を有する、CD3 シグナリングドメインおよび好ましくは、SEQ ID NO: 8を有する、4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み、該VH鎖は、SEQ ID NO: 11または12と少なくとも80%の同一性を有し、該VL鎖は、SEQ ID NO: 16または17と少なくとも80%の同一性を有し、該ポリペプチドは、SEQ ID NO: 25、または31と少なくとも80%の同一性を有する。

#### 【0098】

本発明は、より具体的には、図2に例示される前記のポリペプチド構造V1、V3、またはV5を有するHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体 (scCAR) を開示し、該構造は、以下のCDR配列：

GFSLSRNSVH (SEQ ID NO 13), WLGMIWGGGSTDYNSALKS (SEQ ID NO 14) およびNGGYDVFHY (SEQ ID NO 15) を含むモノクローナル抗HSP70抗体由来の細胞外リガンド結合ドメインVHを含み、好ましくは以下のCDR配列：

RSSTGAVTTSNYANWV (SEQ ID NO 18), GLIGGTNNRAP (SEQ ID NO 19), およびALWYSNHLV (SEQ ID NO 20) を含むモノクローナル抗HSP70抗体由来の細胞外リガンド結合ドメインVLを含み、かつ該構造は概して、ヒンジと、膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB由来の共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含む。

#### 【0099】

本発明は、細胞外リガンド結合ドメインVHおよびVLがヒト化されている、前記の抗HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体 (抗HSP70 scCAR) を開示する。

#### 【0100】

本発明は、モノクローナル抗HSP70抗体由来の細胞外リガンド結合ドメインVHが、以下の配列：

- EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGGGSTDYNS

ALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDATAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS

(マウスcmHsp70. 1に相当する), または

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWGGGSTDYNS

SALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS

(ヒト化cmHsp70. 1に相当する)

のうちの少なくとも一つを含み、

モノクローナル抗HSP70抗体由来のVLが、以下の配列：

- QAVVTQESALTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARF

SGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG (マウスcmHsp70. 1に

相当する),

- QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPA

RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG (ヒト化cmHsp70. 1に

相当する)

のうちの少なくとも一つを含む、前記のHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体 (scCAR) を開示する。

#### 【0101】

本発明は、CD33抗原、CD44抗原、CD47抗原、CD123抗原、CD96抗原、およびT細胞免疫グロブリンムチン3 (TIM-3) のような、HSP70に特異的ではない別の細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む、既に定義されたようなHSP70特異的scCARも開示する。

#### 【0102】

10

20

30

40

50



本発明は、CARポリペプチドが免疫細胞の膜に到達するのを補助するため、シグナルペプチド、好ましくはSEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 2のシグナルペプチドをさらに含む、前記のHSP70特異的scCARを開示する。

【0103】

本発明は、SEQ ID NO: 10のGSリンカーのようなグリシンリッチリンカーがVHとVLとの間に挿入されている、前記のHSP70特異的scCARを開示する。

【0104】

CARの細胞外ドメインへの少なくとも1個のエピトープの挿入

本発明の抗HSP70 CARは、CARの細胞外ドメインへの少なくとも1個のエピトープの挿入を少なくとも含んでいてもよい。

【0105】

少なくとも1個のエピトープが細胞外ドメインへ挿入されている抗HSP70 CARは、単鎖CAR (scCAR) または多鎖CAR (mcCAR) であり得、好ましくはscCARであり得る。

【0106】

これは、サイトカインストームのようなインビボの有害効果を引き起こす場合に、CARを賦与された免疫細胞を枯渇させるためのものである。さらに、そのようなエピトープの挿入または「エピトープタギング」は、精製のため、操作された免疫細胞をインビトロで選別するために有用であり得る。少なくとも1個のエピトープは、そのようなペプチドを認識する特異的抗体が結合するために十分に免疫原性である任意の抗原性ペプチドであり得る。例えば、これは、例えば、少なくとも1コピー、好ましくは2コピーのCD20ミモトープ、好ましくは配列CPYSNPSCS (SEQ ID NO: 33) を、CARポリペプチド配列に挿入することによって入手され得る。単純化の目的のため、以後、N末端からC末端へのscFvの順序を、以下のように提示する: VH鎖、次いで、VL鎖。しかしながら、この順序が逆になることも、本発明の範囲において構想され得る: VL鎖、次いで、VH鎖。

【0107】

少なくとも1個のCD20ミモトープの異なる位置は、図3に図式化される。2コピーのCD20ミモトープは、リンカーによって、相互に、そしてVLにも連結され得る。それらは、任意でリンカーを使用することによって、抗HSP70 scFvと (CD8 のような) ヒンジとの間に挿入されてもよい。CD20ミモトープには、リツキシマブのような抗CD20抗体が結合することができる (McLaughlin P, et al. 1998)。

【0108】

従って、本発明の抗HSP70 CARは、任意でヒト化されている、HSP70細胞表面抗原に結合することができるVH鎖およびVL鎖と、リンカー-Lと、自殺ドメインと、ヒンジまたはその一部と、膜貫通ドメインと、共刺激ドメインと、刺激ドメインとを含み得る。

【0109】

好ましい態様において、キメラscFvに導入されるエピトープは、CD20ミモトープ (SEQ ID NO: 33) であり、選別および/または枯渇の目的のため、それを標的とするために使用される、注入されるmAbは、リツキシマブである。

【0110】

別の態様によると、エピトープはミモトープである。エピトープの構造を模倣する高分子、しばしばペプチドとして、ミモトープは、従来のエピトープより小さいという利点を有し、従って、非コンフォメーション配列のために有益であり、CARのような長いポリペプチドにおいて再現するのがより容易であり得る。セツキシマブのための2種の10アミノ酸ペプチド (Riemer et al., 2005) またはパリビズマブのための24AA (Arbiza et al., 1992) のような、数種の薬学的に承認されているmAbのためのミモトープが、公知である。これらのミモトープは、ファージディスプレイによって同定され得るため、同一のmAbについて、scFvを妨害しない配列を入手するため、そのうちの数種を試みる事が可能である。さらに、それらの使用は、補体依存性細胞傷害 (CDC) を増強することができる。

【0111】

そのようなエピトープおよびミモトープのいくつかの例が、対応する結合mAbと共に、

10

20

30

40

50

以下の表9に提示される。

【 0 1 1 2 】

( 表 9 ) ミモトープおよびエピトープならびに対応するmAb

リツキシマブ		
ミモトープ	SEQ ID NO 33	CPYSNPSLC
パリビズマブ		
エピトープ C	SEQ ID NO 34	NSELSLINDMPITNDQKKLMSNN
セツキシマブ		
ミモトープ 1	SEQ ID NO 35	CQFDLSTRRLKC
ミモトープ 2	SEQ ID NO 36	CQYNLSSRALKC
ミモトープ 3	SEQ ID NO 37	CVWQRWQKSYVC
ミモトープ 4	SEQ ID NO 38	CMWDRFSRWYKC
ニボルマブ		
エピトープ A	SEQ ID NO 39	SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDR
エピトープ B	SEQ ID NO 40	SGTYLCGAISLAPKAQIKE

10

【 0 1 1 3 】

一つの態様において、少なくとも1個のエピトープは、抗Hsp70.1 CARのVH鎖とVL鎖との間に挿入され、任意で、1個のリンカーによってVH鎖およびVL鎖に連結される。

【 0 1 1 4 】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のCD20ミモトープが、抗Hsp70.1 CARのVH鎖とVL鎖との間に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VH鎖およびVL鎖に連結されている。

20

【 0 1 1 5 】

本発明によると、抗HSP70 CARの細胞外ドメイン内のscFvとエピトープとヒンジとの間に使用されるリンカーは、好ましくはGSリンカー（SEQ ID NO : 10）のようなグリシンリッチリンカーであり、可変の長さを有し得る。そのような代替的なリンカーは、Priyanka V, Chichili R, Kumar V, and Sivaraman J (2013) 「タンパク質間相互作用の構造生物学におけるリンカー（Linkers in the structural biology of protein-protein interactions）」Protein Sci. 22(2):153-167の表1に見出され得る。

30

【 0 1 1 6 】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のCD20ミモトープが、抗Hsp70.1 CARのVH鎖とVL鎖との間に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VH鎖およびVL鎖に連結されている。

40

【 0 1 1 7 】

別の態様において、少なくとも1個のエピトープは、CARのN末端、即ち、scFvの前に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VH鎖およびCARのN末端に連結されている。

【 0 1 1 8 】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のエピトープが、CARのN末端、即ち、scFvの前に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VH鎖およびCARのN末端に連結されている。

50

## 【0119】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のエピトープが、CARのN末端、即ち、scFvの前に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VH鎖およびCARのN末端に連結されている。

## 【0120】

別の態様において、少なくとも1個のエピトープは、CARのscFvとヒンジとの間に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VL鎖およびヒンジに連結されている。

10

## 【0121】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のエピトープが、CARのscFvとヒンジとの間に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VL鎖およびヒンジに連結されている。

## 【0122】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3シグナリングドメインとを少なくとも含み、1個のエピトープが、CARのscFvとヒンジとの間に挿入されており、任意で、1個のリンカーによって、VL鎖およびヒンジに連結されている。

20

## 【0123】

好ましい態様において、少なくとも2個のエピトープが、本発明の抗Hsp70 CARの細胞外ドメインに挿入される。

## 【0124】

一態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3シグナリングドメインと、2個のCD20ミモトープとを少なくとも含み、外部結合ドメインは、mHSP70に対するVH鎖およびVL鎖ならびにFc RIII またはCD8 またはIgG1のヒンジを含み；2個のエピトープは、scFvとヒンジとの間にタンデムに挿入されており、2個のエピトープの間およびVHと2個のエピトープとの間にリンカー（SEQ ID NO：10）が介在している。

30

## 【0125】

一態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3シグナリングドメインと、2個のCD20ミモトープとを少なくとも含み、外部結合ドメインは、mHSP70に対するVH鎖およびVL鎖ならびにFc RIII またはCD8 またはIgG1のヒンジを含み；2個のエピトープは、scFvの前、CARのN末端にタンデムに挿入されており、2個のエピトープの間およびCARのN末端にリンカー（SEQ ID NO：10）が介在している。

40

## 【0126】

一つの態様によると、少なくとも2個のエピトープが、それらの間にVHが位置するように、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

## 【0127】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例

50

示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVHが位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

【0128】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVLが位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

10

【0129】

別の態様によると、2個のエピトープが、それらの間にVLが位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

【0130】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVLが位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

20

【0131】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVLが位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

30

【0132】

別の態様によると、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、少なくとも2個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している細胞外結合ドメインを含む。

【0133】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

40

【0134】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、2個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

【0135】

50

別の態様において、3個のエピトープが、本発明の抗Hsp70 CARの細胞外ドメインに挿入される。

【0136】

具体的な態様によると、本発明のmHSP70特異的CARは、3個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している細胞外結合ドメインを含有している。

【0137】

好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、3個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

10

【0138】

より好ましい態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるバージョンV3のポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、細胞外リガンド結合ドメイン抗mHSP70と、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインとを少なくとも含み、3個のエピトープが、それらの間にVH鎖およびVL鎖が位置するよう、細胞外ドメインに挿入されており、任意で、これらの全ての成分の間に少なくとも1個のリンカーが介在している。

20

【0139】

別の態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインと、3個のCD20エピトープとを少なくとも含み、外部結合ドメインは、mHSP70に対するVH鎖およびVL鎖ならびにFc RIII またはCD8 またはIgG1のヒンジを含み；3個のエピトープは、scFvとヒンジとの間にタンデムに挿入されており、3個のエピトープの間およびVHと3個のエピトープとの間にリンカー（SEQ ID NO：10）が介在している。

30

【0140】

別の態様において、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）は、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有し、該構造は、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激ドメインと、CD3 シグナリングドメインと、2個のCD20エピトープと、1個のCD34エピトープとを少なくとも含み、外部結合ドメインは、mHSP70に対するVH鎖およびVL鎖ならびにFc RIII またはCD8 またはIgG1のヒンジを含み；2個のエピトープは、scFvとヒンジとの間にタンデムに挿入されており、CD34エピトープは、2個のCD20エピトープの間に挿入されており、全ての成分の間にリンカー（SEQ ID NO：10）が介在している（エピトープ間およびVHと3個のエピトープとの間）。

40

【0141】

CD34エピトープは、SEQ ID NO：41またはSEQ ID NO：42の中から選択され得る。

【0142】

エピトープを含有している抗mHSP70 CARに関する全ての前記の態様において、細胞外結合ドメインとして使用されるVH鎖およびVL鎖は、好ましくはヒト膜HSP70-1に結合する。

【0143】

好ましい態様において、抗mHSP70モノクローナル抗体に由来するVH鎖およびVL鎖を含む細胞外リガンド結合ドメインを少なくとも含む前記の抗mHSP70 CAR。

【0144】

より具体的には、エピトープは、以下のように、本発明のCARに含まれ得る。

50

## 【 0 1 4 5 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のmAb特異的エピトープを含む。

## 【 0 1 4 6 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、少なくとも1個、2個、または3個のmAb特異的エピトープを含む。

## 【 0 1 4 7 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインが、数個のmAb特異的エピトープを含む時、mAb特異的エピトープは全て同一である。

## 【 0 1 4 8 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインが、数個のmAb特異的エピトープを含む時、mAb特異的エピトープは同一ではない。例えば、細胞外結合ドメインは、2個が同一であり第3のものが異なっている3個のmAb特異的エピトープを含んでいてよい。

## 【 0 1 4 9 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、VH、VL、1個または複数個のmAb特異的エピトープ、好ましくは1個、2個、または3個、より好ましくは2個または3個のmAb特異的エピトープを含む。

## 【 0 1 5 0 】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、以下の配列を含む（N末端が左側に位置している）：

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ ；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$V_1-(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ -エピトープ4- $(L)_x$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_2$ ；

$(L)_x$ -エピトープ1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -エピトープ2- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -エピトープ3- $(L)_x$ ；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3；

$V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L；

$V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1；

$V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1-L；

$V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1-L-エピトープ2；

$V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L；

10

20

30

40

50

$V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3;  
 $V_1-L_1-V_2$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L;  
 エピトープ1- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 エピトープ1-L-エピトープ2- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 エピトープ1-L-エピトープ2-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L-エピトープ2- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L-エピトープ2-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L-エピトープ2-L-エピトープ3-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  
 $V_1-L$ -エピトープ1-L- $V_2$ ;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L$ -エピトープ2-L- $V_2$ ;  
 $V_1-L$ -エピトープ1-L- $V_2-L$ -エピトープ2-L;  
 $V_1-L$ -エピトープ1-L- $V_2-L$ -エピトープ2-L-エピトープ3;  
 $V_1-L$ -エピトープ1-L- $V_2-L$ -エピトープ2-エピトープ3;  
 $V_1-L$ -エピトープ1-L- $V_2-L$ -エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L$ -エピトープ2-L- $V_2-L$ -エピトープ3-L;  
 エピトープ1-L- $V_1-L$ -エピトープ2-L- $V_2-L$ -エピトープ3-L;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L$ -エピトープ2-L- $V_2-L$ -エピトープ3;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ2-L;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ2-L-エピトープ3;  
 L-エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ2-エピトープ3;または  
 エピトープ1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -エピトープ2-L-エピトープ3-エピトープ4  
 式中、

10

20

30

40

50

$V_1$ および $V_2$ はScFvの $V_H$ および $V_L$ であり(即ち、 $V_1$ が $V_L$ でありかつ $V_2$ が $V_H$ であるか、または $V_1$ が $V_H$ でありかつ $V_2$ が $V_L$ であり)、

$L_1$ は、ScFvの $VH$ 鎖を $VL$ 鎖へ連結するのに適した任意のリンカーであり、

$L$ は、リンカー、好ましくはグリシン残基およびセリン残基を含むリンカーであり、細胞外結合ドメイン内の $L$ の存在は各々、同一の細胞外結合ドメイン内の他の $L$ の存在と同一であってもよくまたは異なってもよく、かつ

$x$ は0または1であり、 $x$ の存在は各々、他のものとは独立であり、かつ

エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、mAb特異的エピトープであり、同一であってもよくまたは異なってもよい。

#### 【0151】

いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、以下の配列を含む(N末端が左側に位置している):

$V_H-L_1-V_L-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L;  
 L-エピトープ1-L- $V_H-L$ -エピトープ2-L- $V_L-L$ -エピトープ3-L;  
 $V_L-L^1-V_H-L$ -エピトープ1-L-エピトープ2-L;または  
 L-エピトープ1-L- $V_L-L$ -エピトープ2-L- $V_H-L$ -エピトープ3-L

式中、 $L$ 、 $L_1$ 、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、前記定義の通りである。

#### 【0152】

いくつかの態様において、 $L_1$ はグリシンおよび/またはセリンを含むリンカーである。

いくつかの態様において、 $L_1$ はアミノ酸配列 $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ または $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ を含むリンカーであり、式中、 $n$ は1、2、3、4、または5である。いくつかの態様に

において、 $L_1$ は $(Gly_4Ser)_4$ または $(Gly_4Ser)_3$ である。

【0153】

いくつかの態様において、Lは、可動性リンカー、好ましくはグリシンおよび/またはセリンを含む可動性リンカーである。いくつかの態様において、Lは、SGG, GGS, SGGs, SSGS, GGGG,

SGGGG, GGGGS, SGGGS, GGGGS, SGGGS, GSGGS, GGGGS, SGGGS,

SGGGGS,またはSGGGSGGGGS好ましくはSGG, SGGs, SSGS, GGGG, SGGGS, SGGGS,

SGGGG, GSGGS またはSGGGSGGGGS

より選択されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、細胞外結合ドメインがLのいくつかの存在を含む時、Lは全て同一である。いくつかの態様において、細胞外結合ドメインがLのいくつかの存在を含む時、Lは全て同一ではない。いくつかの態様において、LはSGGGGSである。いくつかの態様において、細胞外結合ドメインは、Lのいくつかの存在を含み、Lは全てSGGGGSである。

【0154】

いくつかの態様において、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、同一であるかまた異っており、SEQ ID NO: 33~SEQ ID NO: 42のいずれかのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープより選択される。

【0155】

いくつかの態様において、エピトープ1、エピトープ2、およびエピトープ3は、同一であるかまたは異っており、イブリットマブ、チウキセタン、ムロモナブ-CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、パシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イビリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、QBEND-10、アレムツズマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるmAb特異的エピトープより選択される。

【0156】

いくつかの態様において、エピトープ1は、SEQ ID NO: 33のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【0157】

いくつかの態様において、エピトープ2は、SEQ ID NO: 33またはSEQ ID NO: 35~38のいずれかのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【0158】

いくつかの態様において、エピトープ3は、SEQ ID NO: 33またはSEQ ID NO: 35~38のいずれかのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【0159】

いくつかの態様において、エピトープ4は、SEQ ID NO: 33またはSEQ ID NO: 35~38のいずれかのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【0160】

いくつかの態様において、エピトープ2は、SEQ ID NO: 33のアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープであり、エピトープ3は、SEQ ID NO: 33またはSEQ ID NO: 35~38のいずれかのアミノ酸配列を有するmAb特異的エピトープである。

【0161】

いくつかの態様において、エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4のうちの一つは、CD34エピトープ、好ましくはSEQ ID 41または42のエピトープである。いくつかの態様において、エピトープ1、エピトープ2、エピトープ3、およびエピトープ4のうちの一つは、CD34エピトープ、好ましくはSEQ ID 41または42のエピトープであり、その他のmAb特異的エピトープは、CD20ミモトープ、好ましくはSEQ ID NO: 33のミモト



ープである。

【0162】

本発明は、必要である場合に、即ち、サイトカインストームのような有害効果を回避するため、該エピトープに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を患者へ投与することによって、本願において開示されたようなHSP70特異的scCARおよび少なくとも1個のエピトープを発現する操作されたリンパ系免疫細胞を患者において枯渇させる方法にも関する。

【0163】

好ましい態様において、Hsp70特異的CARの細胞外ドメインに挿入された少なくとも1個のD20抗原に特異的なモノクローナル抗体リツキシマブが、操作された免疫細胞を枯渇させるため、患者へ投与される。

【0164】

モノクローナル特異的膜HSP70抗体（抗mHsp70）の作製

本発明の別の局面は、VH鎖およびVL鎖が抗mHsp70 CARの構成において細胞外結合ドメインとして使用され得る新規抗膜Hsp70（抗mHsp70）抗体に関する。

【0165】

新しい抗mHsp70抗体は、ポリクローナル抗体、または、好ましくはモノクローナル抗体であり得る。

【0166】

好ましい態様によると、VH鎖およびVL鎖が抗Hsp70 CARの構成において外部結合ドメインとして使用される抗Hsp70抗体は、モノクローナル抗mHsp70抗体である。先行技術におけるモノクローナル抗mHsp70に関して、エピトープはmHsp70の細胞外部分に局在している。例示的なエピトープは、Multhoff et al., 2011の発表において表1に見出され得：例えば、エピトープは、cmHsp70.1抗体およびC92F3A抗体について、それぞれ、アミノ酸450～461、436～503、383～447に位置する。抗体の発見は、先行技術において公知のものと比較して、標的分子に対するアビディティおよび特異性を改善するために有用である。より重要なことには、本発明の抗HSP70 CARに挿入されたscFvの可溶性HSP70抗原との交差反応を防止するため、可溶性HSP70ではなく、膜HSP70のエピトープに対して特異的にモノクローナル抗体を生じさせることが有利であろう。

【0167】

モノクローナル抗体は、ルーチンに、即ち、Yokoyama WM et al, 2006に記載されたように作製される。

【0168】

一つの態様によると、HSP70抗原は、動物免疫の前に粒子の脂質二重層内に挿入される。HSP70タンパク質、好ましくはHSP70-1、またはその一部のそのような挿入は、膜に特異的なモノクローナル抗体が生じる可能性を増加させ得る。

【0169】

脂質二重層を含有している粒子は、媒体送達系として現在使用されている；それらは書籍Domb A et al, 2014に概説されたようなリボソーム、ナノ粒子、リボスフェア等であり得る。一例として、PLGAコアを包囲する自己組み立て脂質二重層コートは、乳化/溶媒蒸発に基づくPLGA粒子合成の界面活性剤成分として脂質を使用することによって達成され得る。コレステロールの脂質二重層または飽和炭素鎖を含む脂質への包含によって、安定化された脂質によってコーティングされた乳酸グリコール酸共重合体微粒子LCMPを作製することも可能である。それらの粒子を作製する技術は、White S et al (2007)、および、例えば、US8968539、US7939270、またはWO 2008102121に概説されたように、先行技術において周知である。

【0170】

好ましくはそのようなHSP70抗原を含有している脂質二重層粒子の注射による動物の免疫は、骨髓腫融合技術を使用することによって作製されるモノクローナル抗膜Hsp70抗体を提供するであろう。

## 【0171】

本発明は、一つの局面において、少なくとも1種のmHsp70抗原、好ましくはmHsp70.1抗原によって動物が免疫され、mHsp70抗原、好ましくはmHsp70.1抗原に結合するモノクローナル抗体が作製され同定される、抗mHsp70モノクローナル抗体、好ましくは抗mHsp70-1モノクローナル抗体を作製する方法を提供する。

## 【0172】

一つの態様によると、以下の工程を含む、少なくとも1種のモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を調製する方法が提供される：

(a) 少なくとも1種のmHsp70抗原、好ましくはmHsp70.1抗原を含有している液体、好ましくは無細胞液体を準備する工程、

(b) 液体中にそれらの複合体が形成されるよう、mHsp70抗原、好ましくはmHsp70.1抗原に特異的なモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体と液体の試料を接触させる工程、

(c) mHsp70抗原、好ましくはmHsp70.1抗原を実質的に含まない部分精製された液体を与えるため、液体から複合体を除去する工程、

(d) 動物、好ましくはマウスを、部分精製された液体によって免疫する工程、

(e) モノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を産生することができるハイブリドーマが形成されるよう、免疫された動物に由来する脾細胞を骨髓腫細胞と融合させる工程、

(f) モノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を産生するようハイブリドーマを培養する工程、

(g) モノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体のうちの1種または複数種を単離する工程、および

(h) 液体が1種の抗原を含有ようになるまで、前回の工程(g)の少なくとも1種のモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を、工程(b)および(c)において使用して、少なくとも一回、工程(b)～(g)を順番に繰り返す工程。

## 【0173】

概して液体は、培地、好ましくは無細胞培地である。

## 【0174】

モノクローナル抗体作製による一つの態様として、即ち、Hanly WC et al, 1995またはHau J et al, 2005に記載されたようなルーチンのプロトコルによって、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヤギ、好ましくはウサギのような種々の動物モデルが使用され得る。

## 【0175】

一つの態様において、動物へ注射される接種原は、膜Hsp70、好ましくは膜Hsp70-1に対して免疫原性である少なくとも1種の抗原を含む。

## 【0176】

本発明によると、免疫原性Hsp70抗原は、単独で、または、好ましくは脂質二重層に挿入されて、ルーチンの抗体作製のための動物へ皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、または腹腔内投与され得る。

## 【0177】

本発明によると、50～1000  $\mu$ gの用量の免疫原性Hsp70抗原が、単独で、または、好ましくは脂質二重層に挿入されて、ウサギへ投与され；10～50  $\mu$ gの用量がマウスへ投与され；50～500  $\mu$ gの用量がモルモットへ投与され；250～5000  $\mu$ gの用量がヤギへ投与される。

## 【0178】

好ましくは注射は通常、背部において、脊椎から遠位の1匹当たり2～4箇所部位においてなされる。典型的には、ウサギにおける推奨される皮下注射の体積および量は、0.1～0.25ml/箇所、最大8～10箇所であるが、合計1.5ml未満である。典型的には、ウサギにおける推奨される筋肉内注射の体積および量は、0.25ml/箇所、最大2箇所であるが、合計

10

20

30

40

50

0.5ml未満である。典型的には、ウサギにおける推奨される皮内注射の体積および量は、0.025ml/箇所、最大5～8箇所であるが、合計0.5ml未満である。

【0179】

フロイントアジュバントのようなアジュバントが使用されてよい。概して、一度に血液体積の10%を、置換なしで除去し、2週間毎に繰り返すことができる。応答は、例えば、イムノアッセイ、ウエスタンブロット、免疫蛍光等によって評価される。良好な応答が生じた時、抗体が引き続き必要とされる場合には、末端採血を実施することができるが、アジュバントが利用される時、ウサギは、好ましくは抗体作製のために18ヶ月より長く維持されるべきではない。

【0180】

さらに、本発明は、本明細書に開示されたモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体のいずれかを産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。

【0181】

本発明は、本明細書に開示されるモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体をコードするDNAを含む単離された核酸；核酸を含むベクター；ベクターを含む宿主細胞；DNAが発現される条件の下で宿主細胞を培養する工程を含み、任意で、宿主細胞培養物から抗体を回収する工程をさらに含む、モノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を作製する方法にも関する。

【0182】

組成物

本発明は、患者におけるHsp70を発現するがん細胞の集団の増殖を阻害するかまたは低下させる方法において使用するための組成物を提供し、該方法は、Hsp70発現がん細胞集団を、Hsp70発現細胞に結合する本発明の抗Hsp70 CART細胞、具体的には、scCARTと接触させる工程を含み、本発明の抗Hsp70 CAR細胞、具体的には、scCARTの、HSP70発現がん細胞との結合は、HSP70発現がん細胞の破壊をもたらす。

【0183】

ある種の局面において、本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTは、骨髓性白血病またはHSP70発現細胞に関連した別のがんを有する対象またはそれらの動物モデルにおいて、陰性対照と比べて、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%（検出不可能なレベルまで）細胞および/またはがん細胞の含量、数、量、または百分率を低下させる。

【0184】

本発明は、HSP70発現細胞に関連した（例えば、血液がんに関連した）障害または状態の防止、処置、および/または管理の方法において使用するための組成物も提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。一つの局面において、対象はヒトである。HSP70発現細胞に関連した障害の非限定的な例には、（慢性関節リウマチのような）炎症性障害および（血液がん、具体的には、AMLまたはAML合併症のような）がんが含まれる。

【0185】

本発明は、HSP70発現細胞に関連した疾患の防止、処置、および/または管理の方法において使用するための組成物も提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。一つの局面において、対象はヒトである。HSP70発現細胞に関連した疾患の非限定的な例には、具体的には、急性骨髓性白血病（AML）が含まれる。

【0186】

本発明は、HSP70発現細胞に関連したがんの再発の処置または防止の方法において使用するための組成物を提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。別の局面において、方法は、有効量の別の治療と組み合わせて、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗H

10

20

30

40

50

SP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、有効量、その必要のある対象へ投与する工程を含む。

【0187】

具体的な態様において、本発明は、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達系を使用して、少なくともいくつかの局面において、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に、単独で、または任意の組み合わせで投与され得る、細胞、CAR構築物、核酸分子、およびベクターを、一部分、企図する。ある種の態様において、投与の後、核酸分子またはベクターは、対象のゲノムへ安定的に組み込まれてもよい。

【0188】

具体的な態様において、ある種の細胞または組織に特異的であって、かつ細胞において持続するウイルスベクターが使用されてもよい。適した薬学的な担体および賦形剤は、当技術分野において周知である。本開示によって調製された組成物は、前述の疾患の防止または処置または遅延のため、使用され得る。

【0189】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載されるモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体と、担体とを含む組成物をさらに提供する。

【0190】

さらに、有効量の本明細書に開示されるモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体に哺乳動物がん細胞を曝す工程を含む、mHsp70、好ましくはmHsp70.1を過剰発現する哺乳動物がん細胞を処置する方法が提供される。

【0191】

本発明は、さらに、容器と該容器内に含有された組成物とを含む製品に関し、該組成物は、本明細書に記載されるモノクローナル抗mHsp70抗体、好ましくはモノクローナル抗mHsp70.1抗体を含む。

【0192】

ポリヌクレオチド、ベクター：

本発明は、上記において詳述されたポリペプチド配列をコードする本発明による抗HSP70 CARの細胞における異種発現を可能にするポリヌクレオチドおよびベクターにも関する。

【0193】

ポリヌクレオチドは、発現カセットまたは発現ベクター（例えば、細菌宿主細胞への導入のためのプラスミド、または昆虫宿主細胞のトランスフェクションのためのバキュロウイルスベクターのようなウイルスベクター、または哺乳動物宿主細胞のトランスフェクションのためのレンチウイルスのようなプラスミドもしくはウイルスベクター）の中に含まれ得る。

【0194】

具体的な態様において、2Aペプチドをコードする配列のようなリボソームスキップ配列をコードする核酸配列を含む一つのポリヌクレオチドまたはベクターに、異なる核酸配列を含めることができる。ピコルナウイルスのアフトウイルス亜群において同定された2Aペプチドは、コドンによってコードされた2つのアミノ酸の間にペプチド結合が形成されない、あるコドンから次のコドンへのリボソーム「スキップ」を引き起こす（（Donnelly and Elliott 2001；Atkins,Wills et al.2007；Doronina,Wu et al.2008）を参照されたい）。「コドン」とは、リボソームによって1つのアミノ酸残基へ翻訳されるmRNA（またはDNA分子のセンス鎖）上の3ヌクレオチドを意味する。従って、ポリペプチドが、インフレームにある2Aオリゴペプチド配列によって隔てられている時、mRNA内の単一の連続するオープンリーディングフレームから、2つのポリペプチドが合成され得る。そのようなリボソームスキップ機序は、当技術分野において周知であり、単一のメッセンジャーRNAによってコードされた数種のタンパク質の発現のため、数種のベクターによって使用されることが公知である。

【0195】

膜貫通ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路へ差し向けるためには、(リーダー配列、プレプロ配列、またはプレ配列としても公知の)分泌シグナル配列が、ポリヌクレオチド配列またはベクター配列の中に提供される。分泌シグナル配列は、膜貫通核酸配列に機能的に連結される。即ち、2種の配列は、正確なリーディングフレームにおいて結合され、新たに合成されたポリペプチドが宿主細胞の分泌経路へ差し向けられるよう位置付けられる。分泌シグナル配列は概して、関心対象のポリペプチドをコードする核酸配列の5'に位置するが、ある種の分泌シグナル配列は、関心対象の核酸配列の他の場所に位置し得る(例えば、Welchら、米国特許第5,037,743号;Hollandら、米国特許第5,143,830号を参照されたい)。好ましい態様において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO:1および2を含むか、またはSEQ ID NO:1および/もしくは2と少なくとも90%、95%、97%、もしくは99%の配列同一性を含む。

10

#### 【0196】

当業者は、遺伝暗号の縮重を考慮して、これらのポリヌクレオチド分子において相当の配列変動が可能であることを認識するであろう。好ましくは、本発明の核酸配列は、哺乳動物細胞における発現のため、好ましくは、ヒト細胞における発現のため、コドン最適化される。コドン最適化とは、関心対象の配列において、所定の種の高発現遺伝子において通常は稀であるコドンを、そのような種の高発現遺伝子において概して高頻度であるコドンへ交換することをさす。そのようなコドンは、交換されるコドンとしてアミノ酸をコードする。

20

#### 【0197】

送達方法

本発明は、本明細書に記載された抗HSP70キメラ抗原受容体(CAR)を免疫細胞において発現させるための種々の手段を包含する。

#### 【0198】

ポリヌクレオチド構築物を細胞へ導入する方法は、当技術分野において公知であり、非限定的な例として、CARをコードするポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムへ組み込まれる安定的形質転換法、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムへ組み込まれない一過性形質転換法、およびウイルスによって媒介される方法を含む。

#### 【0199】

ポリヌクレオチドは、例えば、組換えウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス)、リボソーム等によって細胞へ導入されてよい。例えば、一過性形質転換法には、例えば、微量注入、電気穿孔または微粒子銃、細胞融合が含まれる。ポリヌクレオチドは、細胞において発現されることを考慮して、ベクター、より具体的には、プラスミドまたはウイルスに含まれていてよい。プラスミドベクターは、ベクターを受容した細胞の同定および/または選択を提供する選択マーカーを含んでいてよい。

30

#### 【0200】

異なるトランスジーンが1個のベクターに含まれていてもよい。ベクターは、2Aペプチドをコードする配列のようなりボソームスキップ配列をコードする核酸配列を含んでいてもよい。ピコルナウイルスのアフトウイルス亜群において同定された2Aペプチドは、コドンによってコードされた2個のアミノ酸の間にペプチド結合を形成することなく、1個のコドンから次のコドンへのリボソーム「スキップ」を引き起こす(Donnelly et al., J. of General Virology 82:1013-1025(2001); Donnelly et al., J. of Gen. Virology 78:13-21(1997); Doronina et al., Mol. And. Cell. Biology 28(13):4227-4239(2008); Atkins et al., RNA 13:803-810(2007)参照)。

40

#### 【0201】

「コドン」とは、リボソームによって1個のアミノ酸残基へ翻訳される、mRNA上(またはDNA分子のセンス鎖上)の3ヌクレオチドを意味する。従って、インフレームにある2Aオリゴペプチド配列によってポリペプチドが分離されている時、mRNA内の単一の連続的なオープンリーディングフレームから2個のポリペプチドが合成され得る。そのようなリボソームスキップ機序は、当技術分野において周知であり、単一のメッセンジャーRNAによっ

50

てコードされたいくつかのタンパク質の発現のため、いくつかのベクターによって使用されることが公知である。

#### 【0202】

本発明のより好ましい態様において、本発明によるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、電気穿孔によって細胞へ直接導入されるmRNAであり得る。本発明者らは、T細胞におけるmRNA電気穿孔のための至適条件を決定した。本発明者らは、細胞への材料の送達のために一時的に生細胞を透過性にするのをパルス電場の使用によって可能にするcytoPulseテクノロジーを使用した。PulseAgile (BTX Harvard Apparatus, 84 October Hill Road, Holliston, MA 01746, USA) 電気穿孔波形の使用に基づくテクノロジーは、パルスの持続時間、強度、およびパルス間隔の正確な調節を与える (米国特許第6,010,613号および国際PCT出願WO2004083379)。これらのパラメータは、全て、最小の死亡率での高いトランスフェクション効率のための最適条件に到達するために修飾され得る。基本的には、最初の高電場パルスが孔形成を可能にし、その後のより低い電場パルスが、ポリヌクレオチドの細胞内への移動を可能にする。

10

#### 【0203】

前記の異なる方法は、CAR、特にscCARの細胞への導入を含む。非限定的な例として、CARは、1種のプラスミドベクターによってコードされたトランスジーンとして導入されてもよい。プラスミドベクターは、ベクターを受容した細胞の同定および/または選択を提供する選択マーカーも含有してよい。

20

#### 【0204】

ポリペプチドは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの細胞への導入の結果として、細胞においてインサイチューで合成され得る。あるいは、ポリペプチドを細胞外で作製し、次いで、細胞へ導入してもよい。ポリヌクレオチド構築物を細胞へ導入する方法は、当技術分野において公知であり、非限定的な例として、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムへ組み込まれる安定的形質転換法、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムへ組み込まれない一過性形質転換法、およびウイルスによって媒介される方法を含む。ポリヌクレオチドは、例えば、組換えウイルスベクター (例えば、レトロウイルス、アデノウイルス)、リポソーム等によって細胞へ導入され得る。例えば、一過性形質転換法には、例えば、微量注入、電気穿孔、または微粒子銃が含まれる。ポリヌクレオチドは、細胞において発現されることを考慮して、ベクター、より具体的には、プラスミドまたはウイルスに含まれてよい。

30

#### 【0205】

T細胞の活性化および増加

T細胞の遺伝子修飾の前であっても後であっても、本発明の遺伝子修飾免疫細胞が抗原結合機序に非依存的に活性化され増殖するとしても、本発明の免疫細胞、具体的にはT細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,067,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号；および米国特許出願公開番号20060121005に記載されるような方法を使用して、通常、活性化され増加させられ得る。T細胞はインビトロまたはインビボで増加させられ得る。

40

#### 【0206】

本発明のT細胞は概して、T細胞の活性化シグナルを生成するため、T細胞の表面上のCD3 TCR複合体および共刺激分子を刺激する薬剤との接触によって増加させられる。例えば、カルシウムイオノフォアA23187、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA) のような化学物質、またはフィトヘマグルチニン (PHA) のような細胞分裂促進性レクチンが、T細胞の活性化シグナルを生成するために使用され得る。

#### 【0207】

非限定的な例として、表面に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片または抗CD2抗体と接触させることによって、またはカルシウムイオノフォアと共にプロテイン

50

キナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）と接触させることによって、インビトロでT細胞集団を刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のため、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の集団を、T細胞の増殖の刺激のために適切な条件の下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。T細胞培養のために適切な条件には、血清（例えば、ウシ胎仔血清もしくはヒト胎児血清）、インターロイキン2（IL-2）、インスリン、IFN-g、IL-4、IL-7、GM-CSF、-10、-2、IL-15、TGF、およびTNF-、または当業者に公知の細胞の増殖のためのその他の添加剤を含む、増殖および生存可能性のために必要な因子を含有していてもよい適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640またはX-vivo 5（Lonza））が含まれる。細胞の増殖のためのその他の添加剤には、界面活性剤、プラスマネート（plasmanate）、ならびにN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールのような還元剤が含まれるが、これらに限定されるわけではない。培地には、アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加されており、無血清であるか、または適切な量の血清（もしくは血漿）もしくはホルモンの定義されたセットおよび/もしくはT細胞の増殖および増加のために十分な量のサイトカインが補足されている、RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1、およびX-Vivo 20、Optimizerが含まれ得る。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養にのみ含まれ、対象へ注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5%CO<sub>2</sub>）で維持される。様々な刺激時間に曝されたT細胞は、異なる特徴を示し得る。

10

20

#### 【0208】

別の具体的な態様において、細胞は、組織または細胞との共培養によって増加させられ得る。細胞は、細胞を対象へ投与した後、インビボで、例えば、対象の血液中で増加させられてもよい。

#### 【0209】

##### 操作された免疫細胞

本発明による「細胞」とは概して、自然免疫応答および/または適応免疫応答の開始および/または実行に機能的に関与する造血系起源の細胞をさす。本発明による細胞は、好ましくは、単離された免疫細胞、より好ましくは、ドナーから入手されたT細胞である。本発明による免疫細胞は、幹細胞に由来してもよい。幹細胞は、成体幹細胞、非ヒト胚性幹細胞、より具体的には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髓幹細胞、人工多能性幹細胞、全能性幹細胞、または造血幹細胞であり得る。代表的なヒト細胞は、CD34+細胞である。単離された細胞は、樹状細胞、キラー樹状細胞、マスト細胞、NK細胞、B細胞、または炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、もしくはヘルパーTリンパ球からなる群より選択されるT細胞であってもよい。別の態様において、細胞は、CD4+Tリンパ球およびCD8+Tリンパ球からなる群に由来し得る。

30

40

#### 【0210】

本発明の細胞の増加および遺伝子修飾の前に、細胞の起源は、多様な非限定的な方法を通して対象から入手され得る。細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染の部位に由来する組織、腹水、胸水、脾組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な起源から入手され得る。本発明のある種の態様において、当業者に入手可能であり公知である多数のT細胞株が使用され得る。

#### 【0211】

別の態様において、細胞は、健常ドナー、がんを有すると診断された患者、または感染を有すると診断された患者に由来し得る。別の態様において、細胞は、異なる表現型特徴を示す細胞の混合集団の一部である。上記の方法によって形質転換されたT細胞から入手される細胞株も、本発明の範囲に包含される。免疫抑制処置に対して耐性であり、かつ上記の方法によって入手可能である修飾細胞は、本発明の範囲に包含される。

#### 【0212】

好ましい態様として、本発明は、患者への同種移植のための、機能性のTCRを発現せず

50

、HSP70陽性細胞に対して反応性である、前記のHSP70 CARを賦与されたT細胞または初代T細胞の集団を提供する。

【0213】

より好ましい態様として、本発明は、選択された薬物によって処置された患者への同種移植のための、機能性のTCRを発現せず、選択された薬物に対して耐性である、前記のHSP70 CARを賦与されており、HSP70陽性細胞に対して反応性であるT細胞またはT細胞の集団を提供する。本発明は、参照によって本明細書に組み入れられるWO2014/130635、WO2013176916、WO2013176915に以前に記載されたような形質転換法によって、HSP70 CARをコードするポリヌクレオチドまたはベクターを免疫細胞へエクスピボで導入する工程を含む、免疫治療のための操作された免疫細胞を調製する方法を包含する。

10

【0214】

好ましい態様において、ポリヌクレオチドは、細胞ゲノムに安定的に組み込まれることを考慮して、レトロウイルスベクターによって免疫細胞へ導入される。

【0215】

抗mHsp70 CARと可溶性Hsp70に対する抗体との治療的組み合わせ

本発明は、Hsp70過剰発現細胞に関連した疾患を処置する方法において使用するための、少なくとも、抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞（例えば、T細胞）と可溶性Hsp70に対する抗体との組み合わせを包含する。

【0216】

可溶性Hsp70とは、血漿へ分泌される細胞外HSP70を意味する。Heck et al.2011およびKrause et al,2015を含むいくつかの発表によると、可溶性Hsp70の増加は、炎症状態および酸化ストレス状態に関連しており、血清可溶性Hsp70濃度と、C反応性タンパク質、単球数、およびTNF- $\alpha$ のような炎症のマーカーとの間には正の相関がある。

20

【0217】

好ましい態様によると、本発明は、

少なくとも、抗mHsp70 CARを少なくとも発現するよう修飾された免疫細胞（例えば、T細胞）、および；

可溶性Hsp70に対する少なくとも1種の抗体

を含む、Hsp70過剰発現細胞に関連した疾患を処置するために患者へ投与される治療的組み合わせを提供し；可溶性Hsp70に対する少なくとも1種の抗体は、患者の血漿中の可溶性Hsp70のレベルを、投与前のレベルと比較して、少なくとも50%、好ましくは75%、より好ましくは90%、低下させるために投与され、可溶性特異的Hsp70モノクローナル抗体は、可溶性Hsp70にmHsp70 CARが結合することを防止するために投与される。

30

【0218】

Zang X et al,2010によると、ある研究からの集団の可溶性Hsp70の濃度は、血漿中約0.5~5ng/mlと変動する。従って、即ち、数社によって販売されている抗可溶性Hsp70モノクローナル抗体キットを用いたElisa試験を使用することによって、抗可溶性Hsp70モノクローナル抗体の投与の前に、患者の血漿中の可溶性Hsp70のレベルをモニタリングすることが有利である。次いで、患者の血漿中の可溶性Hsp70のレベルが、投与前のレベルと比較して、少なくとも50%、好ましくは75%、より好ましくは90%、低下した時に、その後のmHsp70 CAR発現免疫細胞の投与を実施することができる。

40

【0219】

この態様は、mHsp70 CARおよび可溶性Hsp70特異的抗体のscFvが、それぞれ、膜HSP70抗原および可溶性HSP70抗原の同一の（またはオーバーラップする）エピトープに結合する場合に特に適応される。

【0220】

可溶性Hsp70に対する抗体の患者への投与は、単回または数回実施され得、好ましくは非経口的に、通常静脈内注入によって投与され得る。投与は、腹腔内、経口、皮下、または筋肉内の経路によってもよい。抗体は概して、患者の体重1kg当たり約0.1~約2g、通常約0.5~約10mg/kg、しばしば、約1~約5mg/kgの範囲で投与される。いくつかの場合にお

50



いて、大きい初回用量を投与した後、周期的な（例えば、毎週の）維持用量を処置期間にわたり投与することが有利であり得る。徐放送達系、ポンプ、および連続注入のためのその他の公知の送達系によって、抗体を送達することもできる。投薬計画は、薬物動態に基づき、特定の抗体の所望の循環血中レベルを提供するため、変動し得る。

【0221】

mHsp70 CAR発現免疫細胞を患者へ投与する前に、例えば、可溶性Hsp70特異的抗体に基づくELISA試験を使用することによって、患者の血液試料中の可溶性Hsp70のレベルをモニタリングすることが有利であり得る。

【0222】

本発明による細胞または細胞の集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸液、植え込み、または移植を含む、任意の便利な様式で実施され得る。本明細書に記載された組成物は、皮下に、皮内に、腫瘍内に、節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内注射もしくはリンパ内注射によって、または腹腔内に、患者へ投与され得る。一つの態様において、本発明の細胞組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。

10

【0223】

細胞または細胞の集団の投与は、体重1kg当たり $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞、好ましくは体重1kg当たり $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞（これらの範囲内の細胞数の整数値を全て含む）の投与からなっていてよい。細胞または細胞の集団は、単回投与されてもよくまたは複数回投与されてもよい。別の態様において、有効量の細胞が単回投与される。別の態様において、有効量の細胞が、ある期間にわたり複数回投与される。投与のタイミングは、管理する医師の判断内にあり、患者の臨床状態に依る。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーのような任意の起源から入手され得る。個々の必要性は変動するが、特定の疾患または状態のための所定の細胞型の有効量の最適範囲の決定は、当技術分野の技術の範囲内である。有効量とは、治療的または予防的な利益を提供する量を意味する。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康、および体重、もしあれば、同時処置の種類、処置の頻度、ならびに所望の効果の性質に依るであろう。

20

【0224】

別の態様において、有効量の細胞またはそれらの細胞を含む組成物は、非経口投与される。投与は静脈内投与であり得る。投与は腫瘍内注射によって直接なされてもよい。

【0225】

好ましい態様によると、mHSP70特異的CARと組み合わせて使用される可溶性Hsp70特異的抗体は、mHSP70特異的CARのエピトープとは異なるエピトープに結合する。一例として、そのような可溶性Hsp70特異的抗体は、Company Stressgen Biotechnologies Corpによって販売されているもの、またはab133063という名称でCompany Abcamによって販売されているものの中から選択され得る。

30

【0226】

CARは、単鎖CAR（scCAR）または多鎖CAR（mcCAR）、好ましくはscCARであり得る。

【0227】

可溶性Hsp70に対する抗体と組み合わせて使用される抗mHsp70 CARは、本願において記載される枯渇/選別の目的のための少なくとも1種のエピトープを含有していてよい。

40

【0228】

一態様において、治療的組み合わせは、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質シグナリングドメインを少なくとも含むmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

【0229】

好ましい態様において、治療的組み合わせは、抗mHSP70細胞外リガンド結合ドメイン、CD8 膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、CD3 シグナリングドメインを少なくとも含むmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

50

## 【0230】

より好ましい態様において、治療的組み合わせは、図2に例示されるV1、V3、またはV5より選択されるポリペプチド構造のうちの一つを有するmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、ヒンジと、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

## 【0231】

別の好ましい態様において、治療的組み合わせは、図2に例示されるV1ポリペプチド構造のうちの一つを有するmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、Fc RIII ヒンジと、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

10

## 【0232】

別の好ましい態様において、治療的組み合わせは、図2に例示されるV3ポリペプチド構造のうちの一つを有するmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、CD8 ヒンジと、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

20

## 【0233】

別の好ましい態様において、治療的組み合わせは、図2に例示されるV5ポリペプチド構造のうちの一つを有するmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該構造は、モノクローナル抗HSP70抗体由来のVHおよびVLを含む細胞外リガンド結合ドメインと、IgG1ヒンジと、CD8 膜貫通ドメインと、CD3 シグナリングドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含む細胞質ドメインとを含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

## 【0234】

別の態様において、治療的組み合わせは、モノクローナル抗HSP70抗体のVHドメインおよびVLドメインに由来するCDRを含む細胞外リガンド結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞質シグナリングドメインとを少なくとも含むmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

30

## 【0235】

具体的な態様において、治療的組み合わせは、モノクローナルmHsp70抗体、好ましくはモノクローナルmHsp70.1抗Hsp70抗体のVHドメインおよびVLドメインを含む細胞外リガンド結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞質シグナリングドメインとを少なくとも含むmHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み；該CARは、可溶性Hsp70に対する抗体に付随している。

## 【0236】

好ましい態様において、治療的組み合わせは、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該CARは、可溶性Hsp70に対するモノクローナル抗体に付随している。

40

## 【0237】

より好ましい態様において、治療的組み合わせは、mHSP70特異的キメラ抗原受容体（抗mHSP70 CAR）を少なくとも含み、該CARは、可溶性Hsp70に対するヒト化モノクローナル抗体に付随している。

## 【0238】

本発明によると、可溶性Hsp70に対する抗体は、例えば、いずれもヒト起源の血漿および血清における可溶性Hsp70に対する有意な感受性を示す、Enzo Life Sciences（キットA

50

DI-EKS-715) もしくはStressgen (キットEKS-700) から市販されているものであってもよく、または可溶性ヒト膜結合型Hsp70に対する抗体は、例えば、ハイブリドーマを作製することによって、そのようなタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製することによって新規に入手されてもよい。

#### 【0239】

本発明によるCARを賦与された免疫細胞を操作する方法

本発明は、低アロ反応性または非アロ反応性であり、同種処置において使用され得(即ち、移植片対宿主反応を誘導するリスクが低下しており)、かつ/または様々な標準治療に対して耐性にされている、抗HSP70 CARを賦与された免疫細胞を作製することも目標とする。

#### 【0240】

本明細書にさらに記載されるように、方法は、少なくとも1種のエンドヌクレアーゼを使用することによって免疫細胞を遺伝子修飾する工程をさらに含み得る。

#### 【0241】

「エンドヌクレアーゼ」という用語は、DNA分子またはRNA分子、好ましくは、DNA分子の核酸間の結合の加水分解(切断)を触媒することができる野生型酵素またはバリエーション酵素をさす。エンドヌクレアーゼは、配列と無関係にDNA分子またはRNA分子を切断するのではなく、「標的配列」または「標的部位」とさらに呼ばれる特定のポリヌクレオチド配列においてDNA分子またはRNA分子を認識し切断する。エンドヌクレアーゼは、典型的には、12塩基対(bp)より長いポリヌクレオチド認識部位、より好ましくは、14~55bpのポリヌクレオチド認識部位を有する時、レアカットエンドヌクレアーゼとして分類され得る。

#### 【0242】

好ましくは、本発明による方法は、レアカットエンドヌクレアーゼを含む。レアカットエンドヌクレアーゼは、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ(Paques and Duchateau 2007)、操作されたジンクフィンガードメインとFokIのような制限酵素の触媒ドメインとの融合に起因するキメラジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)(Porteus and Carroll 2005)、TALEヌクレアーゼ、下記のCRISPR系に由来するCas9エンドヌクレアーゼ(Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013)、または化学的エンドヌクレアーゼ(Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)であり得る。化学的エンドヌクレアーゼにおいては、化学的なまたはペプチド性の切断剤が、核酸のポリマーまたは特定の標的配列を認識する別のDNAのいずれかにコンジュゲートされ、それによって、切断活性を特定の配列へターゲティングする。化学的エンドヌクレアーゼには、特定のDNA配列に結合することが公知の、オルトフェナントロリン、DNA切断分子、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)のコンジュゲートのような合成ヌクレアーゼも包含される(Kalish and Glazer 2005)。レアカットエンドヌクレアーゼは、遺伝子座において遺伝子を不活化するため、または相同組換え(HR)によって、即ち、遺伝子座においてDNA二本鎖破損(DSB)を誘導し、遺伝子修復機序によってこの遺伝子座に外来性DNAを挿入することによって、トランスジーンを組み込むため、使用され得る(Perrin, Buckle et al. 1993; Rouet, Smih et al. 1994; Choulouka, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007)。

#### 【0243】

「TALEヌクレアーゼ」(TALEN)とは、典型的には、TAL(Transcription Activator Like: 転写活性化因子様)エフェクター(TALE)に由来する核酸結合ドメインと、核酸標的配列を切断する1個のヌクレアーゼ触媒ドメインとからなる融合タンパク質を表す。触媒ドメインは、好ましくは、ヌクレアーゼドメインであり、より好ましくは、例えば、I-TevI、CoIE7、NucA、およびFok-Iのようなエンドヌクレアーゼ活性を有するドメインである。具体的な態様において、TALEドメインは、例えば、I-CreIおよびI-OnuIまたはそれらの機能的バリエーションのようなメガヌクレアーゼに融合させられてもよい。より好ましい態様において、ヌクレアーゼは単量体TALEヌクレアーゼである。単量体TALEヌクレアーゼとは、WO2012138927に記載された、操作されたTALリピートとI-TevIの触媒ドメインとの融合

10

20

30

40

50

物のような、特異的な認識および切断のために二量化を必要としないTALEヌクレアーゼである。TALエフェクター (TALE) は、複数の反復配列を含む、細菌種ザントモナス (*Xanthomonas*) 由来のタンパク質であり、各リピートは、核酸標的配列の各ヌクレオチド塩基に対して特異的な2残基 (RVD) を12位および13位に含む。類似したモジュラー1塩基対1塩基核酸結合 (modular base-per-base nucleic acid binding) 特性を有する結合ドメイン (MBBD) も、異なる細菌種において出願人によって最近発見された新しいモジュラータンパク質に由来し得る。新しいモジュラータンパク質は、TALリピートより多くの配列可変性を示すという利点を有する。好ましくは、異なるヌクレオチドの認識に関連したRVDは、Cを認識するためのHD、Tを認識するためのNG、Aを認識するためのNI、GまたはAを認識するためのNN、A、C、G、またはTを認識するためのNS、Tを認識するためのHG、Tを認識するためのIG、Gを認識するためのNK、Cを認識するためのHA、Cを認識するためのND、Cを認識するためのHI、Gを認識するためのHN、Gを認識するためのNA、GまたはAを認識するためのSN、Tを認識するためのYG、Aを認識するためのTL、AまたはGを認識するためのVT、およびAを認識するためのSWである。別の態様において、重要なアミノ酸12および13は、ヌクレオチドA、T、C、およびGに対する特異性をモジュレートするため、具体的には、この特異性を増強するため、他のアミノ酸残基に変異させられてもよい。TALEヌクレアーゼは、既に記載され、遺伝子ターゲティングおよび遺伝子修飾を刺激するために使用されている (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al. 2011)。操作されたTALヌクレアーゼは、商標TALEN (商標) で入手可能であり (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France)、Life Technologies (Carlsbad, California, USA) のような製造業者から注文され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0244】

標的配列を認識し切断する好ましいTALEヌクレアーゼは、PCT/EP2014/075317に記載されている。具体的には、標的遺伝子を不活化する能力を増強するため、変異誘発を増加させるため、リアカットエンドヌクレアーゼと共に、付加的な触媒ドメインをさらに細胞に導入することができる。より具体的には、付加的な触媒ドメインは、DNA末端プロセッシング酵素である。DNA末端プロセッシング酵素の非限定的な例には、5'-3'エキソヌクレアーゼ、3'-5'エキソヌクレアーゼ、5'-3'アルカリエキソヌクレアーゼ、5'フラップエンドヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、ホスファターゼ、加水分解酵素、および鋳型非依存性DNAポリメラーゼが含まれる。そのような触媒ドメインの非限定的な例には、hExoI (EX01\_HUMAN)、酵母ExoI (EX01\_YEAST)、大腸菌 (*E. coli*) ExoI、ヒトTREX2、マウスTREX1、ヒトTREX1、ウシTREX1、ラットTREX1、TdT (末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ)、ヒトDNA2、酵母DNA2 (DNA2\_YEAST) からなる群より選択されるタンパク質ドメインまたはタンパク質ドメインの触媒活性誘導体が含まれる。好ましい態様において、付加的な触媒ドメインは、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有し、より好ましい態様において、付加的な触媒ドメインは、TREX、より好ましくは、TREX2の触媒ドメイン (WO2012/058458) である。別の好ましい態様において、触媒ドメインは、単鎖TREX2ポリペプチドによってコードされる。付加的な触媒ドメインは、任意で、ペプチドリinkerによって、本発明によるヌクレアーゼ融合タンパク質またはキメラタンパク質に融合され得る。

#### 【0245】

「Cas9エンドヌクレアーゼ」とは、II型原核生物CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short palindromic Repeats) 適応免疫系 (概説については (Sorek, Lawrence et al. 2013) 参照) から、RNAガイド (RNA-guided) Cas9ヌクレアーゼ (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) に基づき開発されたゲノム操作ツールを意味する。CRISPR関連 (Cas) 系は、細菌において最初に発見され、ウイルス性またはプラスミド性の外来DNAに対する防御として機能する。CRISPRによって媒介されるゲノム操作は、まず、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) と呼ばれる短い配列モチーフがしばしば隣接している標的配列の選択によって進行する。標的配列選択の後、この標的配列に相補的な特異的なcrRNAが操作される。crRNAと対合し、供給されたCas9タンパク質へ結合した、CRISPR II型系において必要とされるト

ランス活性化crRNA (tracrRNA)。Cas9は、tracrRNAのcrRNAとの塩基対合を容易にする分子アンカーとして作用する (Deltcheva, Chylinski et al. 2011)。この三元複合体において、二重tracrRNA:crRNA構造は、同族標的配列にエンドヌクレアーゼCas9を差し向けるガイドRNAとして作用する。Cas9-tracrRNA:crRNA複合体による標的認識は、標的配列とcrRNAとの間の相同性について標的配列を走査することによって開始される。標的配列-crRNA相補性に加えて、DNAターゲティングは、プロトスペーサーに隣接した短いモチーフ (プロトスペーサー隣接モチーフ - PAM) の存在を必要とする。その後、二重RNAと標的配列との間の対合に続き、Cas9が、PAMモチーフの3塩基上流に平滑末端二本鎖切断を導入する (Garneau, Dupuis et al. 2010)。免疫細胞、具体的には、T細胞におけるCas9の使用は、以前にWO2014191128に記載されている。

10

#### 【0246】

T細胞受容体 (TCR) 成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活化することによるT細胞の修飾

一つの局面によると、例えば、WO 2013/176915に記載されたように、T細胞受容体 (TCR) の1個または複数個の成分を発現する少なくとも1種の遺伝子を不活化することによって、本発明の抗HSP70 CARを賦与されたT細胞を低アロ反応性にすることができる。この不活化は、HLAまたは 2mのタンパク質発現をコードするかまたは制御する遺伝子のような別の遺伝子の不活化と組み合わせられてもよい。従って、移植片対宿主症候群および移植片拒絶のリスクは有意に低下する。

20

#### 【0247】

細胞を比較的非同種にする方法は、T細胞受容体 (TCR) 成分をコードする少なくとも1種の遺伝子、特に、TCR 遺伝子、および/またはTCR 遺伝子を不活性化する工程を含むことができる。

#### 【0248】

T細胞受容体 (TCR) の1個以上の成分を不活性化することによって、同種移植のために適したCAR発現免疫細胞を調製するための、WO2013/176915に開示された方法は、全て、参照によって本明細書に組み入れられる。

#### 【0249】

本発明は、T細胞受容体 (TCR) の1個以上の成分を発現する少なくとも1種の遺伝子が不活性化されている抗HSP70CAR発現免疫細胞を包含する。従って、本発明は、T細胞受容体 (TCR) の1個以上の成分を発現する少なくとも1種の遺伝子が不活性化されている、抗HSP70CAR発現T細胞を提供する。

30

#### 【0250】

TCR遺伝子の不活性化とは、関心対象の遺伝子が、機能性のタンパク質の形態で発現されないことを意味する。具体的な態様において、方法の遺伝子修飾は、レアカットエンドヌクレアーゼが1種の標的遺伝子において特異的に切断を触媒し、それによって、標的遺伝子を不活性化するよう、1種のレアカットエンドヌクレアーゼを、操作すべき準備された細胞において発現させることに頼る。レアカットエンドヌクレアーゼによって引き起こされた核酸鎖破断は概して、相同組換えまたは非相同末端結合 (NHEJ) の別の機序を通して修復される。しかしながら、NHEJは、切断の部位においてDNA配列に変化をもたらすことが多い不完全な修復過程である。機序は、直接再連結 (Critchlow and Jackson 1998) を通した、またはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合 (Betts, Brenchley et al. 2003; Ma, Kim et al. 2003) を介した、2個のDNA末端のうち残っているものの再結合を含む。非相同末端結合 (NHEJ) を介した修復は、小さい挿入または欠失をもたらすことが多く、特異的な遺伝子ノックアウトの作製のために使用され得る。その修飾は、少なくとも1個のヌクレオチドの置換、欠失、または付加であり得る。切断によって誘導された変異誘発イベント、即ち、NHEJのイベントに続く変異誘発イベントが起こった細胞は、当技術分野において周知の方法によって同定されかつ/または選択され得る。具体的な態様において、個々の各試料の細胞においてT細胞受容体 (TCR) の成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活性化する工程は、T細胞受容体 (TCR) の成分をコードする少なくとも1種

40

50

の遺伝子を妨害することができるレアカットエンドヌクレアーゼを細胞へ導入する工程を含む。より具体的な態様において、個々の各試料の細胞は、T細胞受容体（TCR）の成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を妨害することができるレアカットエンドヌクレアーゼをコードする核酸によって形質転換され、レアカットエンドヌクレアーゼが細胞において発現させられる。

【0251】

好ましい態様において、免疫細胞をさらに操作する方法は、DNA切断によって前述の遺伝子を選択的に不活化する特異的なレアカットエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、具体的には、mRNAを、T細胞へ導入する工程を含む。より好ましい態様において、レアカットエンドヌクレアーゼは、TALEヌクレアーゼまたはCas9エンドヌクレアーゼである。TALヌクレアーゼは、他の型のレアカットエンドヌクレアーゼより高い特異性および切断効率を有することがこれまでに実証されているため、操作された免疫細胞を一定のターンオーバーで大規模に作製するための最良のエンドヌクレアーゼである。

10

【0252】

本発明によると、T細胞受容体（TCR）の1種または複数種の成分が不活化されている抗HSP70 CAR免疫細胞は、医薬として使用されることが意図される。

【0253】

薬剤耐性T細胞

別の局面によると、HSP70陽性悪性細胞に関連したがん、具体的には、AMLを処置するための標準治療として使用される免疫抑制薬または化学療法処置に対して耐性にするため、本発明の抗HSP70 CAR発現免疫細胞をさらに遺伝子操作することができる。

20

【0254】

代謝拮抗薬、アルキル化剤、アントラサイクリン、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、白金化合物、および紡錘体毒のようないくつかの細胞傷害性薬剤（抗がん薬）が、がん細胞を死滅させるため、開発されている。しかしながら、免疫治療のような新規治療と共にこれらの薬剤を導入することには問題がある。例えば、化学療法剤は、薬剤の非特異的な毒性プロファイルのため、頑強な抗腫瘍免疫担当細胞の確立にとって有害であり得る。細胞増殖経路を標的とする低分子に基づく治療も、抗腫瘍免疫の確立を妨げる場合がある。一時的に有効である化学療法計画を、新規の免疫担当細胞治療と組み合わせることができれば、抗新生物治療の有意な改善が達成され得る（概説について（Dasgupta, McCarty et al. 2011））。

30

【0255】

がん治療および同種免疫細胞の選択的生着を改善するため、化学療法剤の毒性副作用から保護するための薬剤耐性が、同種細胞に付与される。薬剤耐性遺伝子を発現するT細胞は、薬物感受性細胞と比べて、生存し、繁殖するため、免疫細胞の薬剤耐性は、インビボまたはエクシボでのそれらの濃縮も可能にする。

【0256】

化学療法剤に対して耐性となるよう免疫細胞を操作する方法は、参照によって本明細書に完全に組み入れられるPCT/EP2014/075317に開示されている。

【0257】

具体的には、本発明は、以下の工程を含む、T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子が不活化され、薬剤耐性を付与するために1種の遺伝子が修飾される、免疫治療のために適切であるよう同種細胞を操作する方法に関する：

40

抗HSP70 CAR発現T細胞を準備する工程、T細胞を発現させる工程、

T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活化することによって、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

抗HSP70 CAR発現T細胞へ薬剤耐性を付与するため、抗HSP70 CAR、好ましくは、ヒト化HSP70 CARを発現するT細胞を修飾する工程、

操作された抗HSP70 CAR発現T細胞を薬物の存在下で増加させる工程。

【0258】

50

あるいは、本発明は、以下の工程を含む方法に関する：

抗HSP70 CAR、好ましくは、ヒト化HSP70 CARを発現するT細胞を準備する工程、

抗HSP70 CAR発現T細胞へ薬剤耐性を付与するため、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活化することによって、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

操作された抗HSP70 CAR発現T細胞を薬物の存在下で増加させる工程。

【0259】

具体的には、本発明は、以下の工程を含む、T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子が不活化され、薬剤耐性を付与するために1種の遺伝子が修飾される、免疫治療のために適切であるよう同種細胞を操作する方法にも関する：

抗HSP70 CAR；好ましくは、ヒト化HSP70 CARを発現するT細胞を準備する工程、

T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活化することによって、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

抗HSP70 CAR発現T細胞へ薬剤耐性を付与するため、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

操作された抗HSP70 CAR発現T細胞を薬物の存在下で増加させる工程。

【0260】

あるいは、本発明は、以下の工程を含む方法に関する：

抗HSP70 CAR；好ましくは、ヒト化HSP70 CARを発現するT細胞を準備する工程、

抗HSP70 CAR発現T細胞へ薬剤耐性を付与するため、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

T細胞受容体（TCR）成分をコードする少なくとも1種の遺伝子を不活化することによって、抗HSP70 CAR発現T細胞を修飾する工程、

操作された抗HSP70 CAR発現T細胞を薬物の存在下で増加させる工程。

【0261】

抗HSP70 CAR発現免疫細胞における薬剤耐性遺伝子の発現

具体的な態様において、少なくとも1種の薬剤耐性遺伝子の発現によって、薬剤耐性をT細胞に付与することができる。薬剤耐性遺伝子とは、化学療法剤（例えば、メトトレキサート）のような薬剤に対する「耐性」をコードする核酸配列をさす。換言すると、細胞における薬剤耐性遺伝子の発現は、薬剤耐性遺伝子なしの対応する細胞の増殖より大きな程度に薬剤の存在下で細胞の増殖を可能にする。細胞における薬剤耐性遺伝子の発現は、薬剤の存在下での細胞の増殖を可能にし、その活性には影響を与えない。本発明の薬剤耐性遺伝子は、代謝拮抗薬、メトトレキサート、ビンブラスチン、シスプラチン、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞傷害性抗生物質、抗イムノフィリン、それらの類似体または誘導体等に対する耐性をコードしてよい。

【0262】

一つの態様において、本発明の薬剤耐性遺伝子は、薬物（または薬剤）、具体的には、アラシチン（Aracytine）、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミトキサントロン、ベプシド、エトポシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸の組み合わせ、メクロレタミン、プロカルバジン、クロラムブシル、シタラビン、アントラサイクリン、6-チオグアニン、ヒドロキシ尿素、プレドニゾン、およびそれらの組み合わせより選択される抗がん薬に対する耐性を付与することができる。

【0263】

標的細胞に薬剤耐性を付与するために使用される可能性のある数種の薬剤耐性遺伝子が同定されている（Takebe,Zhao et al.2001；Sugimoto,Tsukahara et al.2003；Zielske,Reese et al.2003；Nivens,Felder et al.2004；Bardenheuer,Lehmberg et al.2005；Kushman,Kabler et al.2007）。

【0264】

10

20

30

40

50

薬剤耐性遺伝子の一例は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の変異型または修飾型でもあり得る。DHFRは、細胞内のテトラヒドロ葉酸の量の制御に関与する酵素であって、DNA合成のために必須である。メトトレキサート（MTX）のような葉酸類似体は、DHFRを阻害し、従って、抗新生物剤として臨床的に使用されている。治療において使用される葉酸代謝拮抗薬による阻害に対して増加した耐性を有するDHFRの異なる変異型が記載されている。具体的な態様において、本発明による薬剤耐性遺伝子は、メトトレキサートのような葉酸代謝拮抗薬処置に対する耐性を付与する少なくとも1個の変異を含むヒト野生型DHFR（Gen Bank：AAH71996.1）の変異型をコードする核酸配列であり得る。具体的な態様において、DHFRの変異型は、位置G15、L22、F31、またはF34、好ましくは、位置L22またはF31に少なくとも1個の変異型アミノ酸を含む（Schweitzer,Dicker et al.1990；国際出願WO94/24277；米国特許US6,642,043）。具体的な態様において、DHFR変異型は、位置L22およびF31に2個の変異型アミノ酸を含む。本明細書に記載されたアミノ酸位置の対応は、GenBank：AAH71996.1に示された野生型DHFRポリペプチドの型のアミノ酸の位置でしばしば表される。具体的な態様において、位置15のセリン残基が、好ましくは、トリプトファン残基に交換される。

10

#### 【0265】

別の具体的な態様において、位置22のロイシン残基が、好ましくは、変異体DHFRの葉酸代謝拮抗薬との結合を妨害するであろうアミノ酸、好ましくは、フェニルアラニンまたはチロシンのような無電荷アミノ酸残基に交換される。別の具体的な態様において、位置31または34のフェニルアラニン残基が、好ましくは、アラニン、セリン、またはグリシンのような小さい親水性アミノ酸に交換される。

20

#### 【0266】

本明細書において使用されるように、「葉酸代謝拮抗剤」または「葉酸類似体」とは、何らかのレベルで葉酸代謝経路に干渉するための分子をさす。葉酸代謝拮抗剤の例には、例えば、メトトレキサート（MTX）；アミノプテリン；トリメトトレキサート（Neutrexin（商標））；エダトレキサート；N10-プロバルギル-5,8-ジデアザ葉酸（CB3717）；ZD1694（Tumodex）；5,8-ジデアザイソ葉（dideazaisofolic）酸（IAHQ）；5,10-ジデアザテトラヒドロ葉酸（DDATHF）；5-デアザ葉酸；PT523（N<sup>-</sup>-(4-アミノ-4-デオキシプテロイル)-N<sup>-</sup>-ヘミフタロイル-L-オルニチン）；10-エチル-10-デアザアミノプテリン（DDATHF、ロマトレキサール（lomatrexol））；ピリトレキシム（piritrexim）；10-EDAM；ZD1694；GW1843；ペメトレキサート（Pemetrexate）、およびPDX（10-プロバルギル-10-デアザアミノプテリン）が含まれる。

30

#### 【0267】

薬剤耐性遺伝子の別の例は、グアノシンヌクレオチドのデノボ合成における律速酵素であるイノシン-5'-リン酸脱水素酵素II（IMPDH2）の変異型または修飾型でもあり得る。IMPDH2の変異型または修飾型は、IMPDH阻害剤耐性遺伝子である。IMPDH阻害剤は、ミコフェノール酸（MPA）、またはそのプロドラッグ、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）であり得る。変異体IMPDH2は、IMPDH阻害剤に対する有意に増加した耐性をもたらす変異を、少なくとも1個、好ましくは、2個、野生型ヒトIMPDH2（NP\_000875.2）のMAP結合部位に含み得る。変異は、好ましくは、位置T333および/またはS351にある（Yam,Jensen et al.2006；Sangiolo,Lesnikova et al.2007；Jonnalagadda,Brown et al.2013）。具体的な態様において、位置333のトレオニン残基は、イソロイシン残基に交換され、位置351のセリン残基は、チロシン残基に交換される。本明細書に記載されたアミノ酸位置の対応は、NP\_000875.2に示された野生型ヒトIMPDH2ポリペプチドの型のアミノ酸の位置でしばしば表される。

40

#### 【0268】

別の薬剤耐性遺伝子は、カルシニューリンの変異型である。カルシニューリン（PP2B）は、多くの生物学的過程に関与しており、T細胞活性化の中心である、広範に発現されているセリン/トレオニンプロテインホスファターゼである。カルシニューリンは、触媒サブユニット（CnA；3種のアイソフォーム）および制御サブユニット（CnB；2種のアイソフ

50



ーム)から構成されたヘテロ二量体である。T細胞受容体の会合の後、カルシニューリンは、転写因子NFATを脱リン酸し、NFATが核に移行し、IL2のような重要な標的遺伝子を活性化することを可能にする。FKBP12との複合体のFK506、またはCyPAとの複合体のシクロスポリンA(CsA)は、カルシニューリン活性部位へのNFATの到達を阻止し、その脱リン酸を防止し、それによって、T細胞活性化を阻害する(Brewin,Mancao et al.2009)。本発明の薬剤耐性遺伝子は、FK506および/またはCsAのようなカルシニューリン阻害剤に対して耐性のカルシニューリンの変異型をコードする核酸配列であり得る。具体的な態様において、変異型は、位置:V314、Y341、M347、T351、W352、L354、K360に野生型カルシニューリンヘテロ二量体の少なくとも1個の変異型アミノ酸を含み得、好ましくは、位置T351およびL354またはV314およびY341に二重変異を含み得る。具体的な態様において、GenBank:ACX34092.1に相当する配列において、位置341のバリン残基は、リジン残基またはアルギニン残基に交換され得、位置341のチロシン残基は、フェニルアラニン残基に交換され得;位置347のメチオニンは、グルタミン酸残基、アルギニン残基、またはトリプトファン残基に交換され得;位置351のトレオニンは、グルタミン酸残基に交換され得;位置352のトリプトファン残基は、システイン残基、グルタミン酸残基、またはアラニン残基に交換され得、位置353のセリンは、ヒスチジン残基またはアスパラギン残基に交換され得、位置354のロイシンは、アラニン残基に交換され得;位置360のリジンは、アラニン残基またはフェニルアラニン残基に交換され得る。本明細書に記載されたアミノ酸位置の対応は、(GenBank:ACX34092.1)に示された野生型ヒトカルシニューリンヘテロ二量体aポリペプチドの型のアミノ酸の位置でしばしば表される。

10

20

#### 【0269】

別の具体的な態様において、変異型は、位置:V120、N123、L124、またはK125に野生型カルシニューリンヘテロ二量体bの少なくとも1個の変異アミノ酸を含み得、好ましくは、位置L124およびK125に二重変異を含み得る。具体的な態様において、GenBank:ACX34095.1に相当するアミノ酸配列において、位置120のバリンは、セリン残基、アスパラギン酸残基、フェニルアラニン残基、またはロイシン残基に交換され得;位置123のアスパラギンは、トリプトファン、リジン、フェニルアラニン、アルギニン、ヒスチジン、またはセリンに交換され得;位置124のロイシンは、トレオニン残基に交換され得;位置125のリジンは、アラニン、グルタミン酸、トリプトファンに交換され得、またはロイシン-アルギニンもしくはイソロイシン-グルタミン酸のような2個の残基が、位置125のリジンの後に付加されてもよい。本明細書に記載されたアミノ酸位置の対応は、(GenBank:ACX34095.1)に示された野生型ヒトカルシニューリンヘテロ二量体bポリペプチドの型のアミノ酸の位置でしばしば表される。

30

#### 【0270】

別の薬剤耐性遺伝子は、ヒトアルキルグアニントランスフェラーゼ(hAGT)をコードするO(6)-メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ(MGMT)である。AGTは、ニトロソウレアおよびテモゾロミド(TMZ)のようなアルキル化剤の細胞傷害効果に対する耐性を付与するDNA修復タンパク質である。6-ベンジルグアニン(6-BG)は、ニトロソウレアの毒性を強化するAGTの阻害剤であり、この薬剤の細胞傷害効果を強化するためにTMZと同時投与される。AGTのバリエーションをコードするMGMTの数種の変異型は、6-BGによる不活性化に対して高度に耐性であるが、DNA傷害を修復する能力を保持している(Maze,Kurpad et al.1999)。具体的な態様において、AGT変異型は、参照番号P16455としてUniprotデータベースに開示されているアミノ酸配列において、野生型AGT位置P140に変異型アミノ酸を含み得る。好ましい態様において、位置140のプロリンはリジン残基に交換される。

40

#### 【0271】

別の薬剤耐性遺伝子は、多剤耐性タンパク質1(MDR1)遺伝子であり得る。この遺伝子は、細胞膜を介した代謝副産物の輸送に関与するP-糖タンパク質(P-GP)として公知の膜糖タンパク質をコードする。P-Gpタンパク質は、数種の構造的に無関係な化学療法剤に対して広い特異性を示す。

#### 【0272】

50

多剤耐性タンパク質1の過剰発現は、ミトキサントロンのような薬物に対する耐性を付与することが記載されている (Charles S.Morrow, Christina Peklak-Scott, Bimjhana Biswokarma, Timothy E.Kute, Pamela K.Smitherman, and Alan J.Townsend. 多剤耐性タンパク質1 (MRP1, ABCC1) はグルタチオン依存性薬物排出を介してミトキサントロンに対する耐性を媒介する (Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) Mediates Resistance to Mitoxantrone via Glutathione-Dependent Drug Efflux) Mol Pharmacol April 2006 69: 1499-1505)。

【0273】

従って、MDR-1 (NP\_000918) をコードする核酸配列の発現によって、薬剤耐性を細胞に付与することができる。

【0274】

薬剤耐性細胞を調製するさらに別の方式は、アムサクリンに対する耐性を付与するため、ヒトトポイソメラーゼII遺伝子のArg486およびGlu571における変異のような特異的な変異を有する細胞を調製することである (S.PATEL, B.A.KELLER, and L.M.FISHER. 2000. MOLECULAR PHARMACOLOGY. Vol 57:p784-791(2000))。

【0275】

薬剤耐性細胞を調製するさらに別の方式は、ダウノルビシンに対する耐性を付与するため、マイクロRNA-21を過剰発現する細胞を調製することである (白血病K562細胞株におけるPTEN発現の制御によるダウノルビシンに対する耐性におけるmiR-21の関与 (Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line) Bai, Haitao et al. FEBS Letters, Volume 585, Issue 2, 402-408)。

【0276】

好ましい態様において、そのような薬剤耐性を付与するmRNAまたはタンパク質を保持している細胞は、薬物の存在下でまたは薬物の投与時に薬剤耐性細胞の選択的な破壊を可能にする、発現が条件付きである阻害性のmRNAまたは遺伝子も含む。

【0277】

薬剤耐性遺伝子は、細胞傷害性抗生物質に対する耐性を付与することもでき、ble遺伝子またはmcrA遺伝子であり得る。免疫細胞におけるble遺伝子またはmcrAの異所発現は、化学療法剤、それぞれ、ブレオマイシンまたはマイトマイシンCに曝された時の選択有利性を与得る。

【0278】

遺伝子治療のための最も実用的なアプローチは、ベクター、好ましくは、ウイルスベクターによる効率的な遺伝子送達を使用することによる、T細胞を操作するための遺伝子の付加である。従って、具体的な態様において、薬剤耐性遺伝子は、好ましくは、少なくとも1種のベクターによってコードされたトランスジーンを、細胞へ導入することによって、細胞において発現させられ得る。

【0279】

一つの態様において、薬剤耐性遺伝子または薬物に対する耐性を付与する修飾型遺伝子を保持する細胞は、その誘導が細胞死を誘発し、選択的な破壊を可能にする誘導可能な自殺遺伝子も含む。

【0280】

ゲノムへの遺伝子のランダム挿入は、挿入された遺伝子または挿入部位の近くの遺伝子の不適切な発現をもたらす場合がある。ゲノム内の特定の部位へ遺伝子をターゲティングするための、内在性配列を含む外来性核酸の相同組換えを使用した特異的遺伝子治療は、確実なT細胞の操作を可能にする。前記のように、方法の遺伝子修飾工程は、内在性遺伝子と外来性核酸との間に相同組換えが起こるよう、薬剤耐性遺伝子をコードする配列および内在性遺伝子の一部分を少なくとも含む外来性核酸を細胞へ導入する工程を含み得る。具体的な態様において、内在性遺伝子は、相同組換えの後、野生型遺伝子が、薬物に対する耐性を付与する遺伝子の変異型に交換されるような、野生型「薬剤耐性」遺伝子であり

10

20

30

40

50

得る。

【0281】

ヌクレオチド鎖切断による破断は、相同組換えの割合を刺激することが公知である。従って、具体的な態様において、本発明の方法は、内在性遺伝子内の標的配列を切断することができるレアカットエンドヌクレアーゼを細胞において発現させる工程をさらに含む。内在性遺伝子は、例えば、DHFR、IMPDH2、カルシニューリン、またはAGTをコードすることができる。レアカットエンドヌクレアーゼは、TALEヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9エンドヌクレアーゼ、MBBBDヌクレアーゼ、またはメガヌクレアーゼであり得る。

【0282】

抗HSP70 CAR発現免疫細胞における薬剤感受性増加遺伝子の不活性化

別の具体的な態様において、薬剤感受性増加遺伝子の不活性化によって、本発明の細胞（抗HSP70 CAR発現免疫細胞）へ薬剤耐性を付与することができる。

【0283】

本発明者らは、免疫治療のためにT細胞を操作するため、具体的には、治療剤（抗がん薬）と組み合わせて使用され得よう抗HSP70 CAR発現免疫細胞を操作するため、可能性のある薬剤感受性増加遺伝子を不活性化しようと努力した。

【0284】

遺伝子の不活性化とは、関心対象の遺伝子が機能性のタンパク質の形態で発現されないことを意味する。具体的な態様において、方法の遺伝子修飾は、レアカットエンドヌクレアーゼが1種の標的遺伝子において特異的に切断を触媒し、それによって、標的遺伝子を不活性化するよう、1種のレアカットエンドヌクレアーゼを、操作すべき準備された細胞において発現させることに頼る。具体的な態様において、少なくとも1種の薬剤感受性増加遺伝子を不活性化する工程は、少なくとも1種の薬剤感受性増加遺伝子を妨害することができるレアカットエンドヌクレアーゼを細胞へ導入する工程を含む。より具体的な態様において、細胞は、薬剤感受性増加遺伝子を妨害することができるレアカットエンドヌクレアーゼをコードする核酸によって形質転換され、レアカットエンドヌクレアーゼが細胞において発現される。レアカットエンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9ヌクレアーゼ、MBBBDヌクレアーゼ、またはTALEヌクレアーゼであり得る。好ましい態様において、レアカットエンドヌクレアーゼは、TALEヌクレアーゼである。

【0285】

好ましい態様において、T細胞へ薬剤耐性を付与するために不活性化され得る薬剤感受性増加遺伝子は、ヒトデオキシシチジンキナーゼ（dCK）遺伝子である。この酵素は、デオキシリボヌクレオシド、デオキシシチジン（dC）、デオキシグアノシン（dG）、およびデオキシアデノシン（dA）のリン酸化のために必要とされる。プリンヌクレオチド類似体（PNA）は、dCKによって、一リン酸PNA、二リン酸PNA、および三リン酸PNAに代謝される。三リン酸型、具体的には、クロファラビン三リン酸は、DNA合成についてATPと競合し、アポトーシス促進剤として働き、トリヌクレオチド産生に關与するリボヌクレオチドレダクターゼ（RNR）の強力な阻害剤である。

【0286】

好ましくは、T細胞におけるdCKの不活性化は、TALEヌクレアーゼによって媒介される。この目標を達成するため、数種のdCK TALEヌクレアーゼの対が、設計され、ポリヌクレオチドレベルで組み立てられ、配列決定によってバリデートされている。本発明に従って使用され得るTALEヌクレアーゼ対の例は、PCT/EP2014/075317に示される。

【0287】

T細胞におけるこのdCK不活性化は、クロファラビン、フルダラビン、またはデシタビン（Dacogen）のようなプリンヌクレオチド類似体（PNA）に対する耐性を付与する。

【0288】

別の好ましい態様において、T細胞におけるdCK不活性化は、TRAC遺伝子の不活性化と組

10

20

30

40

50

み合わせられ、これらの二重ノックアウト (KO) T細胞は、クロファラビンのような薬物に対して耐性になり、かつ比較的非同種になる。この二重特色は、免疫治療のための「既製の」同種細胞が、化学療法と共に、がんを有する患者を処置することを可能にする、治療的な目標のために特に有用である。この二重KO不活性化dCK/TRACは、同時にまたは連続的に実施され得る。本発明において成功を与えたTALEヌクレアーゼdCK/TRAC対の一例、具体的には、2種の遺伝子座 (dCKおよびTRAC) における標的配列は、PCT/EP2014/075317に記載されている。

#### 【0289】

不活性化され得る酵素の別の例は、ヒトヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子 (Genbank: M26434.1) である。具体的には、HPRTは、がん、具体的には、白血病を有する患者を処置するために現在使用されている、HPRTによって細胞傷害性チオグアニンヌクレオチドに変換される細胞分裂阻害性代謝物質6-チオグアニン (6TG) に対する耐性を付与するため、操作T細胞において不活性化され得る (Hacke, Treger et al. 2013)。グアニン類似体は、ホスホリボシル部分の付加を触媒し、6メルカプトプリン (6MP) および6チオグアニン (6TG) を含むTGMPグアニン類似体の形成を可能にするHPRTトランスフェラーゼによって代謝され、白血病を処置するためのリンパ枯渇 (lymphodepleting) 薬として通常使用される。それらは、HPRT (ホスホリボシル部分の付加を触媒し、TGMPの形成を可能にするヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ) によって代謝される。その後のリン酸化は、三リン酸化型の形成をもたらし、それは、最終的にはDNAに組み込まれる。DNAへ組み入れられた後、チオGTPは、チオレート基を介してDNA複製のフィデリティーを損ない、細胞完全性にとって高度に有害であるランダム点変異を生成する。

#### 【0290】

従って、本発明は、抗HSP70 CAR発現細胞、具体的には、抗HSP70 CAR発現T細胞を提供し、ここでCARはSEQ ID NO: 21~32によるポリペプチド配列を有し、好ましくはCARにおいてscFvはヒト化されており、dCK遺伝子は不活化されている。

#### 【0291】

別の態様において、T細胞の表面に通常発現されているCD3の不活化は、テプリズマブのような抗CD3抗体に対する耐性を付与することができる。

#### 【0292】

抗HSP70 CAR発現免疫細胞の多剤耐性

別の具体的な態様において、本発明者らは、患者が異なる薬物によって処置された時の操作されたT細胞の選択を媒介するため、複数の薬物に対して耐性の同種T細胞、具体的には、同種抗HSP70 CAR発現T細胞を使用して、「既製の」免疫治療戦略を開発しようと努力した。治療効率は、多剤耐性同種T細胞を遺伝子操作することによって有意に増強され得る。そのような戦略は、相乗効果を示す薬物の組み合わせに応答する腫瘍の処置において特に有効であり得る。さらに、多剤耐性の操作されたT細胞は、増加させることができ、最小限の用量の薬剤を使用して選択され得る。

#### 【0293】

従って、本発明による方法は、T細胞へ多剤耐性を付与するため、T細胞を修飾する工程を含み得る。多剤耐性は、複数種の薬剤耐性遺伝子を発現させることによって、または複数種の薬剤感受性増加遺伝子を不活化することによって、付与され得る。別の具体的な態様において、多剤耐性は、少なくとも1種の薬剤耐性遺伝子を発現させ、少なくとも1種の薬剤感受性増加遺伝子を不活化することによって、T細胞に付与され得る。具体的には、多剤耐性は、DHFRの変異型、IMPDH2の変異型、カルシニューリンの変異型、MGMTの変異型、ble遺伝子、およびmcrA遺伝子のような少なくとも1種の薬剤耐性遺伝子を発現させ、HPRT遺伝子のような少なくとも1種の薬剤感受性増加遺伝子を不活化することによって、T細胞に付与され得る。好ましい態様において、多剤耐性は、HPRT遺伝子を不活化し、DHFRの変異型を発現させることによって；またはHPRT遺伝子を不活化し、IMPDH2の変異型を発現させることによって；またはHPRT遺伝子を不活化し、カルシニューリンの変異型を発現さ

せることによって；HPRT遺伝子を不活化し、MGMTの変異型を発現させることによって；HPRT遺伝子を不活化し、ble遺伝子を発現させることによって；HPRT遺伝子を不活化し、mcrA遺伝子を発現させることによって、付与され得る。

【0294】

一つの態様において、本発明は、複数種の薬剤耐性遺伝子を発現するか、または複数種の薬剤感受性増加遺伝子が不活化されている、同種抗HSP70 CAR発現T細胞を提供する。

【0295】

抗HSP70 CAR発現免疫細胞における自殺遺伝子

いくつかの場合において、操作されたT細胞は投与後数年にわたり増加し存続することができるため、投与されたT細胞の選択的な欠失を可能にする安全機序を含めることが望ましい場合がある。従って、いくつかの態様において、本発明の方法は、組換え自殺遺伝子によるT細胞の形質転換を含んでいてよい。組換え自殺遺伝子は、対象へ投与された後のT細胞の直接毒性および/または調節されない増殖のリスクを低下させるため、使用される(Quintarelli C, Vera F, blood 2007; Tey SK, Dotti G., Rooney CM, boil blood marrow transplant 2007)。自殺遺伝子は、インビボで形質転換細胞の選択的な欠失を可能にする。具体的には、自殺遺伝子は、非毒性のプロドラッグを細胞傷害性薬物へ変換するかまたは毒性遺伝子発現産物を発現する能力を有する。換言すると、「自殺遺伝子」とは、単独でまたは他の化合物の存在下で細胞死を引き起こす産物をコードする核酸である。

【0296】

そのような自殺遺伝子の代表例は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼをコードするものである。付加的な例は、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ、および5-フルオロシトシンを高度に毒性の化合物5-フルオロウラシルに変換することができる細菌遺伝子シトシンデアミナーゼである。自殺遺伝子には、非限定的な例として、カスパーゼ9またはカスパーゼ8またはシトシンデアミナーゼも含まれる。カスパーゼ9は、特異的な化学的二量化誘導因子(CID)を使用して活性化され得る。自殺遺伝子は、細胞の表面に発現され、細胞を治療用モノクローナル抗体に対して感受性にすることができるポリペプチドであってもよい。本明細書において使用されるように、「プロドラッグ」とは、毒性生成物へ変換され得る本発明の方法において有用な任意の化合物を意味する。プロドラッグは、本発明の方法において自殺遺伝子の遺伝子産物によって毒性生成物へ変換される。そのようなプロドラッグの代表例は、HSVチミジンキナーゼによってインビボで毒性化合物へ変換されるガンシクロビルである。ガンシクロビル誘導体は、その後、腫瘍細胞に対して毒性となる。プロドラッグの他の代表例には、アシクロビル、FIAU[1-(2-デオキシ-2-フルオロ-β-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル]、VZV-TKのための6-メトキシプリンアラビノシド、およびシトシンデアミナーゼのための5-フルオロシトシンが含まれる。

【0297】

一つの好ましい自殺遺伝子系は、抗HSP70 CARから独立に発現される、抗CD20 mAbリツキシマブによって認識される抗原性モチーフ、具体的には、WO2013153391に記載されたいわゆるRQR8ポリペプチドに含まれるようなQBen10を含む、組換え抗原性ポリペプチドを利用する。次いで、必要とされた時に、認可されている抗体薬リツキシマブが、細胞枯渇のために使用され得る。

【0298】

一つの態様において、本発明は、複数種の薬剤耐性遺伝子を発現するかまたは複数種の薬剤感受性増加遺伝子が不活化されており、自殺遺伝子が細胞の破壊を可能にする、同種抗HSP70 CAR発現T細胞を提供する。

【0299】

具体的には、本発明は、同種T細胞、具体的には、同種抗HSP70 CAR発現T細胞、好ましくは、好ましくはヒト化されたcmHsp70.1抗体に由来するscfvと80%~100%の同一性を有するペプチドを含む同種抗HSP70 CAR発現T細胞に関し、好ましくはヒト化されたcmHsp70.1抗体に由来するscfvと80%~100%の同一性を有するペプチドを含む同種抗HSP70 CAR発

10

20

30

40

50

現T細胞は、より具体的には、薬物に対して耐性であり、免疫治療のために特に適している。

【0300】

薬物に対する耐性は、薬剤感受性増加遺伝子の不活化によって、または薬剤耐性遺伝子の発現によって、付与され得る。本発明に適した薬物のいくつかの例は、クロファラビンもしくはフルダラビンのようなプリンヌクレオシド類似体（PNA）、または6-メルカプトプリン（6MP）および6チオグアニン（6TG）のようなその他の薬物である。

【0301】

一つの局面において、本発明は、免疫細胞をクロファラビンまたはフルダラビンのようなプリンヌクレオシド類似体（PNA）に対して耐性になるよう操作し、それによって、これらの従来の化学療法によって予め処置された患者におけるがん免疫治療処置において使用することができるようにする方法を提供する。

10

【0302】

dcK遺伝子および/またはHPRT遺伝子のような、薬物に対する細胞の感受性を担う1種または複数種の遺伝子（薬剤感受性増加遺伝子）を不活化することによって、薬物に対する耐性をT細胞に付与することができる。

【0303】

別の局面によると、薬剤耐性遺伝子を発現させることによって、薬物に対する耐性をT細胞に付与することができる。ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、イノシンーリン酸脱水素酵素2（IMPDH2）、カルシニューリン、またはメチルグアニントランスフェラーゼ（MGMT）のような数種の遺伝子のバリエーション対立遺伝子は、本発明による細胞へ薬剤耐性を付与することが同定されている。

20

【0304】

例えば、Campath（登録商標）（アレムツズマブ）またはリツキシマブおよびグルココルチコイドによる処置の薬物標的であるCD52およびグルココルチコイド受容体（GR）を、これらの処置に対して細胞を耐性にし、特異的な抗HSP70 CARを賦与されていない患者自身のT細胞と比べて競争有利性を与えるため、不活化することができる。別の免疫抑制薬であるテプリズマブに対する耐性を付与するため、CD3遺伝子の発現を抑制するかまたは低下させることもできる。化学療法において、具体的には急性リンパ芽球性白血病の処置のため、通常使用される細胞分裂阻害剤である6-チオグアニンに対する耐性を付与するため、HPRTの発現を本発明に従って抑制するかまたは低下させることもできる。

30

【0305】

免疫チェックポイント操作細胞

本発明のさらなる局面によると、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1（またはblimp1）、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3より選択される遺伝子のようなT細胞活性化の制御因子として働く「免疫チェックポイント」として働くタンパク質をコードする遺伝子を不活化することによって、より高活性にするかまたは消耗を制限するため、免疫細胞をさらに操作することができ、好ましくは、遺伝子はPDCD1またはCTLA-4である。発現を低下させるかまたは抑制することができる遺伝子の例は、表10にも示される。

40

【0306】

本発明は、WO2014/184741において言及されるように、T細胞受容体（TCR）の1個または複数個の成分を発現する少なくとも1種の遺伝子が不活化されており、かつ/または遺伝子CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PR

50

DM1 (もしくはblimp1)、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3より選択される1種の遺伝子が不活化されている、抗HSP70 CAR、具体的には、抗HSP70を発現する同種T細胞も提供する。

【0307】

一つの態様において、遺伝子は、2ミクログロブリンタンパク質をコードするT細胞活性化の制御因子として働く遺伝子である。

【0308】

本発明のさらなる局面によると、薬物、具体的には、がん、具体的には、AMLのようなHSP70発現細胞によって媒介されるがんに対する化学療法において使用される薬物に対して耐性にするため、本発明の抗HSP70 CAR免疫細胞をさらに操作することができる。これは、薬物に対する耐性を付与する遺伝子を導入することによって達成され得る。この同一の遺伝子は、以前に記載されたような遺伝子誘導可能阻害/発現系を使用することによってオンオフされ得る (Garcia EL, Mills AA (2002) 誘導可能Creによって媒介される切り出しによる致死の回避 (Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision.) Semin Cell Dev Biol 13:151-8; Lewandoski M (2001) マウスにおける遺伝子発現の条件的調節 (Conditional control of gene expression in the mouse.) Nat Rev Genet 2:743-55; Scharfenberger L, Hennerici T, Kirly G et al. (2014) 皮膚生物学におけるトランスジェニックマウステクノロジー: 完全または組織特異的ノックアウトマウスの生成 (Transgenic mouse technology in skin biology: Generation of complete or tissue-specific knockout mice.) J Invest Dermatol 134:e16; Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO et al. (1998) マウスにおける時間的にかつ空間的に制御された体細胞変異誘発 (Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice.) Nucleic Acids Res 26:1427-32)。

【0309】

従って、(i) T細胞受容体 (TCR) の1個または複数個の成分を発現する少なくとも1種の遺伝子が不活化されており、(ii) 薬物に対する耐性を付与する少なくとも1種の遺伝子が組み入れられているか、または薬物に対する感受性を付与する遺伝子が欠失しているかもしくは不活化されるよう変異しており、(iii) 任意で、以下の表9に開示された遺伝子より選択される別の遺伝子が不活化されている、抗HSP70 CAR発現薬剤耐性免疫細胞が、本発明の目的である。

【0310】

本発明は、単離された抗HSP70 CAR免疫細胞、または本発明の方法によって入手可能な細胞株、より具体的には、本明細書に記載されたタンパク質、ポリペプチド、対立遺伝子バリエーション、変更されたもしくは欠失させられた遺伝子、またはベクターのいずれかを含む単離された細胞を包含する。

【0311】

本発明の免疫細胞または細胞株は、外来性の組換えポリヌクレオチド、具体的には、cCARもしくは自殺遺伝子をさらに含んでもよく、または治療用生成物としての、理想的には「既製の」生成物としてのそれらの効力に寄与するチェックポイントタンパク質もしくはそれらのリガンドをコードする遺伝子の変更もしくは欠失を含んでもよい。別の局面において、本発明は、前記の方法によって入手可能な操作された免疫細胞を少なくとも一回投与することによって、患者におけるがんを処置するかまたは防止する方法に関する。

【0312】

(表10) 免疫チェックポイントタンパク質をコードする遺伝子のリスト

10

20

30

40

経路		経路内の不活化され得る遺伝子
共阻害受容体	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	IgSF ファミリー	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
		SIGLEC9
	CD244(2b4)	CD244
細胞死受容体	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
	FAS	FADD, FAS
サイトカインシグナリング	TGF $\beta$ シグナリング	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	IL10 シグナリング	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	IL6 シグナリング	IL6R, IL6ST
TCRシグナリングの防止		CSK, PAG1
		SIT1
誘導性Treg	誘導性Treg	FOXP3
消耗を調節する転写因子	消耗を調節する転写因子	PRDM1 (=blimp1、ヘテロ接合体マウスはwtまたは条件的K0より良好に慢性ウイルス感染をコントロールする)
		BATF
低酸素によって媒介される寛容	iNOSによって誘導される グアニル酸シクラーゼ	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

10

20

30

40

50

## 【 0 3 1 3 】

薬剤耐性同種CAR T細胞の細胞傷害性の試験のためのHSP70+/Luc+薬剤耐性Daudi細胞

本発明は、CAR T細胞に特異的な表面受容体および耐性遺伝子の両方を発現する標的細胞を製造する方法も包含する。これらの標的細胞は、具体的には、CAR T細胞の細胞傷害性の試験のために有用である。これらの細胞は、臨床的に関連する用量のクロファラビン



に対して容易に耐性であり、ルシフェラーゼ活性を保有している。この特色の組み合わせは、マウスモデルにおけるインビボの追跡を可能にするか、または必要とされた時にそれらを破壊する。

【0314】

より具体的には、それらは、クロファラビンまたはその他のPNAの存在下で、マウスにおける薬剤耐性T細胞の細胞傷害特性を査定するために使用され得る。クロファラビン耐性Daudi細胞は、薬剤耐性B細胞悪性疾患を保有している導入治療から再発した急性骨髄性白血病（AML）患者の生理学的状態を模倣する。従って、これらの細胞は、薬剤耐性CAR T細胞の信頼性および細胞傷害性を評価するために非常に興味深い。好ましくは、これらの標的細胞は、HSP70+ルシフェラーゼ+ Daudi細胞である。

10

【0315】

単離された細胞

得られる細胞は、上記のHSP70特異的キメラ抗原受容体を細胞膜に発現する操作された免疫細胞、具体的には、初代Tリンパ球に由来し、任意で、抗がん薬に対して耐性であり、TCRまたはTCRをコードする遺伝子の欠失を保持している操作された免疫細胞である。

【0316】

本発明は、TCRの発現が抑制されている前記の操作された免疫細胞を開示する。

【0317】

本発明は、少なくとも1種のMHCタンパク質、好ましくは、2mまたはHLAの発現が低下しているかまたは抑制されている前記の操作された免疫細胞を開示する。2mとは、2ミクログロブリンを表し、HLAはヒト白血球抗原を表す。MHCタンパク質は、クラスIまたはクラスIIのMHCタンパク質である。

20

【0318】

本発明は、少なくとも1種の免疫抑制薬、化学療法薬、または抗がん薬に対する耐性を付与するために変異させられた前記の操作された免疫細胞を開示する。

【0319】

本発明は、治療において使用するための前記の操作された免疫細胞を開示する。

【0320】

本発明は、患者がヒトである前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

30

【0321】

本発明は、状態がHSP70発現細胞を特徴とする前悪性または悪性のがん状態である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

【0322】

本発明は、状態がHSP70発現細胞の過多を特徴とする状態である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

【0323】

本発明は、悪性がん状態が血液がん状態である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

40

【0324】

本発明は、血液がん状態が白血病または悪性リンパ増殖性障害である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

【0325】

本発明は、白血病が急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、および骨髄異形成症候群からなる群より選択される、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

【0326】

本発明は、白血病が急性骨髄性白血病（AML）である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

50

## 【0327】

本発明は、血液がんが悪性リンパ増殖性障害である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

## 【0328】

本発明は、悪性リンパ増殖性障害がリンパ腫である、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

## 【0329】

本発明は、リンパ腫が多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、ならびに濾胞性リンパ腫（小細胞型および大細胞型）からなる群より選択される、前記の治療において使用するための操作された免疫細胞を開示する。

10

## 【0330】

本発明は、がん細胞の障害を引き起こすのに有効な量の、前記の抗HSP70 CARを少なくとも発現する操作された細胞と、血液がん細胞を接触させる工程を含む、血液がん細胞に障害を与える方法を開示する。

## 【0331】

従って、本発明は、以下の工程を含む、免疫細胞を操作する方法を開示する：

- (a) 免疫細胞を準備する工程、
- (b) 上記の少なくとも1種のHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を該細胞の表面に発現させる工程。

20

## 【0332】

本発明は、以下の工程を含む、前記の免疫細胞を操作する方法を開示する：

- (a) 免疫細胞を準備する工程、
- (b) HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを該細胞へ導入する工程、
- (c) 該細胞においてポリヌクレオチドを発現させる工程。

## 【0333】

本発明は、以下の工程を含む、前記の免疫細胞を操作する方法を開示する：

- (a) 免疫細胞を準備する工程、
- (b) HSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを該細胞へ導入する工程、
- (c) HSP70に特異的ではない少なくとも1種の他のキメラ抗原受容体を導入する工程。

30

## 【0334】

本発明は、以下の工程を含む、その必要のある対象を処置する方法を開示する：

- (a) 前記のHSP70単鎖特異的キメラ抗原受容体を表面に発現する免疫細胞を準備する工程、
- (b) 免疫細胞を患者へ投与する工程。

## 【0335】

本発明は、免疫細胞がドナーから提供される、前記のその必要のある対象を処置する方法を開示する。

## 【0336】

本発明は、免疫細胞が患者自身から提供される、前記のその必要のある対象を処置する方法を開示する。

40

## 【0337】

薬学的組成物

本発明は、本発明の操作された免疫細胞と少なくとも1つの許容可能な担体とを含む薬学的組成物を提供する。

## 【0338】

治療的適用

別の態様において、上記の種々の方法によって入手された単離された細胞または単離された細胞に由来する細胞株は、医薬として使用され得る。

50

## 【0339】

別の態様において、医薬は、その必要のある患者において、がんを処置するため、具体的には、白血病の処置のため、使用され得る。

## 【0340】

別の態様において、本発明による単離された細胞または単離された細胞に由来する細胞株は、その必要のある患者におけるがんの処置のための医薬の製造において使用され得る。

## 【0341】

具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現T細胞は、AML、AML亜型、AML関連合併症、AML関連状態の処置のための医薬として提供される。

10

## 【0342】

別の態様において、医薬は、HSP70発現細胞によって媒介される病理学的状態、またはHSP70発現細胞の直接もしくは間接の活性を特徴とする状態を処置するために使用され得る。

## 【0343】

別の局面において、本発明は、以下の工程のうちの少なくとも一つを含む、その必要のある患者を処置する方法に頼る：

(a) 上記の方法のいずれか一つによって入手可能な免疫細胞を準備する工程、

(b) 形質転換された免疫細胞を患者へ投与する工程。

## 【0344】

20

一つの態様において、本発明のT細胞は、頑強なインビボT細胞増加を受けることができ、延長された時間、存続することができる。

## 【0345】

処置は、寛解、治癒、または予防であり得る。それは、自家免疫治療の一部または同種免疫治療処置の一部のいずれかであり得る。自家とは、患者を処置するために使用される細胞、細胞株、または細胞の集団が、患者またはヒト白血球抗原（HLA）適合ドナーに起因することを意味する。同種とは、患者を処置するために使用される細胞または細胞の集団が、患者ではなくドナーに起因することを意味する。

## 【0346】

開示された方法と共に使用され得る細胞は、上記セクションに記載されている。処置は、HSP70発現細胞、具体的には、HSP70発現細胞の過多を特徴とする前悪性または悪性のがん状態を有すると診断された患者を処置するために使用され得る。そのような状態は、白血病のような血液がんにおいて見出される。

30

## 【0347】

一つの態様において、本発明は、HSP70発現細胞によって媒介される疾患、具体的には、HSP70発現細胞によって媒介される血液がんの処置において使用するための組成物を提供し、該組成物は、本発明の抗HSP70 CAR発現T細胞を含む。

## 【0348】

本明細書に開示された、HSP70によって媒介されるかまたはHSP70が関与する任意の他の悪性リンパ増殖性障害も、本発明の抗HSP70 CAR発現細胞によって改善され得る。

40

## 【0349】

好ましい態様において、本発明の抗HSP70 CAR発現細胞を使用して処置され得るがんは、白血病、白血病に関連した疾患、またはそれらの合併症である。

## 【0350】

本発明の抗HSP70 CAR発現細胞を使用して処置され得る白血病は、急性骨髄性白血病（AML）であり得る。本発明の抗HSP70 CAR発現細胞を使用して処置され得るAMLまたはAML亜型は、具体的には、HSP70陽性細胞が関与している、急性骨髄芽球性白血病、最小分化型急性骨髄芽球性白血病、成熟を伴わない急性骨髄芽球性白血病、顆粒球成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病、前骨髄球性または急性前骨髄球性白血病（APL）、急性骨髄単球性白血病、骨髄好酸球増加を伴う骨髄単球性白血病、急性単芽球性白血病（M5a）または急性単

50

球性白血病 (M5b)、赤白血病 (M6a) および極めて稀な純赤血球性白血病 (M6b) を含む急性赤血球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性好塩基球性白血病、骨髓繊維症を伴う急性汎骨髄症であり得る。

【0351】

AMLの垂型には、ヘアリーセル白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病も含まれる。AMLは特異的な遺伝子異常を伴うAMLとして分類されてもよい。分類は、導入治療に対する応答、再発リスク、生存を予測する核型の能力に基づく。

【0352】

従って、本発明の抗HSP70 CAR発現細胞を使用して処置され得るAMLは、8番染色体と21番染色体との間の転座を有するAML、16番染色体における転座または反転を有するAML、9番染色体と11番染色体との間の転座を有するAML、15番染色体と17番染色体との間の転座を有するAPL (M3)、6番染色体と9番染色体との間の転座を有するAML、3番染色体における転座または反転を有するAML、1番染色体と22番染色体との間の転座を有するAML (巨核芽球性) であり得る。

10

【0353】

本発明は、これらの特定の細胞遺伝学的マーカーに関連したAMLの処置のために特に有用である。

【0354】

本発明は、オールトランス型レチノイン酸 (ATRA) 16-19を使用して同定されたt(15;17)(q22;q21)を有する患者のような、AMLの特定の細胞遺伝学的サブセットを有する患者の処置のため、および高用量シタラビンの反復投与を使用して同定されたt(8;21)(q22;q22)またはinv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)を有する患者の処置のための抗HSP70 CAR発現T細胞も提供する。

20

【0355】

好ましくは、本発明は、完全寛解率および生存率が劣っていることが示されている、-5/del(5q)、-7、3qの異常、または複合核型のような異常を有する患者の処置のための抗HSP70 CAR発現T細胞を提供する。

【0356】

「治療剤」、「化学療法剤」または「薬物」または「抗がん薬」という用語は、本明細書において使用されるように、がん細胞と相互作用し、それによって、細胞の増殖状態を低下させかつ/または細胞を死滅させることができる医薬、好ましくは、化合物またはその誘導体をさす。化学療法剤または「抗がん薬」の例には、アルキル化剤 (例えば、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、オキサリプラチン、ウラムスチン (uramus tine)、テモゾロミド、ホテムスチン)、代謝拮抗薬 (例えば、クロファラビン、フルダラビン、または2'-デオキシアデノシンのようなプリンヌクレオシド代謝拮抗薬、メトトレキサート (MTX)、5-フルオロウラシルまたはその誘導体、アザチオプリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、ペメトレキセド)、抗腫瘍抗生物質 (例えば、マイトマイシン、アドリアマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン)、植物由来抗腫瘍剤 (例えば、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール、ビンブラスチン、ビノレルビン、ドセタキセル、パクリタクセル)、トポイソメラーゼ阻害剤 (イリノテカン、トポテカン、エトポシド) が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

30

40

【0357】

好ましい態様において、治療剤、化学療法薬とは、本明細書において使用されるように、がんを処置するため、具体的には、造血がん細胞、さらに具体的には、AMLを処置し、それによって、がん細胞の増殖状態を低下させかつ/またはがん細胞を死滅させるために使用され得る化合物またはそれらの誘導体をさす。化学療法剤の例には、アラシチン、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミ

50

トキサントロン、ペブシド、エトボシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、メクロレタミン、プロカルバジン、クロラムブシル、およびそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0358】

本発明の他の態様において、本発明の細胞は、アラシチン、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミトキサントロン、ペブシド、エトボシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、シタラビン、アントラサイクリン、6-チオグアニン、ヒドロキシ尿素、プレドニゾン、およびそれらの組み合わせより選択される薬物（または薬剤）と共に患者へ投与される。

【0359】

10

そのような薬剤には、抗がん剤、TRIMETHOTRIMXATE（商標）（TMTX）、TEMOZOLOMIDE（商標）、RALTRITREXED（商標）、S-(4-ニトロベンジル)-6-チオイノシン（NBMPR）、6-ベンジルグアニジン（6-BG）、ビスクロロニトロソウレア（BCNU）、およびCAMPTOTHECIN（商標）、またはそれらのいずれかの治療用誘導体がさらに含まれ得るが、これらに限定されない。

【0360】

より好ましい態様において、抗HSP70 CARを発現するT細胞は、アラシチン、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミトキサントロン、ペブシド、エトボシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、およびそれらの組み合わせより選択される少なくとも1種の治療剤と組み合わせて、患者へ投与される。

20

【0361】

本明細書において使用されるように、薬剤に対して「耐性または抵抗性」である細胞とは、修飾なしの細胞の増殖を阻害するかまたは防止する量の薬剤の存在下で、増殖するよう、遺伝子修飾されている細胞を意味する。

【0362】

慢性骨髄性白血病（CML）の処置

別の態様において、本発明の抗mHsp70.1 CARは、単独で、または別の分子と組み合わせて、慢性骨髄性白血病（CML）の処置のために使用される。

【0363】

30

CMLは、成熟顆粒球（好中球、好酸球、および好塩基球）ならびにそれらの前駆細胞の増殖が見出されるクローン性骨髄幹細胞障害である。それは、フィラデルフィア染色体と呼ばれる特徴的な染色体転座に関連した一種の骨髄増殖性疾患である。西洋諸国において、それは、全ての成人白血病の15～20%、（小児科集団を含む）白血病全体の14%を占める。

【0364】

一つの態様において、本発明の抗mHsp70.1 CARは、BCR/ABL融合遺伝子（フィラデルフィア染色体またはPh）の発現をもたらすt(9;22)(q34;q11)転座を含む染色体異常に関連していることが見出されている、CML疾患によって影響を受けたヒトの処置のため、単独で、または別の分子と組み合わせて使用される。

40

【0365】

一つの態様において、本発明の抗mHsp70.1 CARは、Gバンド法による染色体調製物上には不可視の隠れた転座、または9番および22番染色体のみならず他の染色体も含むバリアント転座のいずれかに関連していることが見出されている、CML疾患によって影響を受けたヒトの処置のため、単独で、または別の分子と組み合わせて使用される。

【0366】

さらに一つの態様において、本発明の抗mHsp70.1 CARは、白血球（WBC）数上昇に至る成熟骨髄系細胞のクローン増加を、いわゆる慢性期に、概して呈する、CML疾患によって影響を受けたヒトの処置のため、単独で、または別の分子と組み合わせて使用される。

【0367】

50

## 固形腫瘍の処置

別の態様において、本発明の抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、固形腫瘍を処置するために使用される。

【0368】

一つの具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、結腸直腸がんを処置するために使用される。

【0369】

別の具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、肺がんを処置するために使用される。

【0370】

別の具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、神経細胞がんを処置するために使用される。

【0371】

別の具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、膵臓がんを処置するために使用される。

【0372】

別の具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、肝臓転移を処置するために使用される。

【0373】

別の具体的な態様において、抗HSP70 CAR発現免疫細胞は、頭頸部がんを処置するために使用される。

【0374】

## 患者の群

好ましい態様において、本発明は、60歳を超える患者または20歳未満の患者におけるAMLの処置を提供する。

【0375】

より好ましい態様において、本発明は、小児処置、特に、AMLまたはAMLに関連する疾患もしくは合併症に対する小児処置を提供する。

【0376】

さらに別の好ましい態様において、本発明は、低いか、不良であるか、または不利な状況を有する、即ち、5年生存率未満の予測生存を有するAML患者において、処置として使用される。この群において、以下の細胞遺伝学的特徴：-5；5q；-7；7q-；11q23；non t(9；11)；inv(3)；t(3；3)；t(6；9)；t(9；22)を有するAMLに罹患している患者は、不良リスク状態に関連しており（Byrd J.C.et al., December 15, 2002; Blood: 100 (13)）、本発明に従ってまたは本発明の目的によって処置されることが特に企図される。

【0377】

一つの態様において、本発明の抗HSP70 CAR発現T細胞は、AMLを有する患者における導入治療、AMLの寛解後治療、またはコンソリデーション治療として使用され得る。

【0378】

一つの態様において、本発明の抗HSP70 CAR発現T細胞は、AML再発の症例、または難治性もしくは抵抗性のAMLの症例において、より好ましくは、少なくとも1種の他の抗がん薬と組み合わせて使用され得る。

【0379】

別の好ましい態様において、本発明の少なくとも1種の抗HSP70 CAR発現細胞は、特に、抗がん処置の後、骨髄枯渇の間または骨髄移植の前、骨髄破壊の後に起こるがん細胞発達を防止するために使用される。

【0380】

## AML合併症

一つの具体的な態様において、本発明は、患者、具体的には、AMLに関連した合併症を起こしている患者の健康状態を改善する医薬を提供する。より好ましくは、本発明の操作

10

20

30

40

50

された抗HSP70 CAR発現T細胞は、本発明の少なくとも1種の抗HSP70 CARを発現しており、AMLに関連した合併症の処置のための医薬として使用される。

【0381】

AMLに関連した合併症または疾患には、先行する骨髄異形成期、二次性白血病、具体的には、二次性AML、高白血球数、およびアウエル小体の欠如が含まれ得る。とりわけ、白血球停滞および中枢神経系（CNS）の関与、白血球増多、残存疾患も、AMLに関連した合併症または疾患と見なされる。

【0382】

AML関連疾患

一つの態様において、本発明は、AMLに関連した病理学的状態の処置のための抗HSP70 CAR発現T細胞も提供する。 10

【0383】

本発明は、AML関連骨髄性新生物、急性骨髄性白血病および骨髄異形成症候群のための治療、再発性または難治性の急性骨髄性白血病の処置、成人における再発性または難治性の急性前骨髄球性白血病の処置、急性前骨髄性白血病の処置、60歳より高齢の成人における急性骨髄性白血病の処置を提供する。

【0384】

別の局面によると、本発明は、AML関連疾患、具体的には、AMLに関連した血液悪性疾患の処置のための組成物を提供する。

【0385】

AML状態に関連した血液悪性疾患には、骨髄系血液細胞の無効生成（または異形成）およびAMLへの形質転換のリスクによって統合された血液学的状態の多様なコレクションである骨髄異形成症候群（MDS、以前は「前白血病」として公知であった）が含まれる。

【0386】

AMLのリスクに関連したその他の病理学的状態または遺伝的症候群は、本発明の適切な使用によって改善され得、遺伝的症候群には、ダウン症、トリソミー、ファンコニー貧血、ブルーム症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワッハマン・ダイヤモンド症候群、リー・フラウメニ症候群、神経線維腫症1型、（コストマン症候群とも呼ばれる）重症先天性好中球減少症）が含まれる。

【0387】

組成物

本発明は、疾患を処置する方法において使用するための本発明による操作されたT細胞を含む組成物も提供する。

【0388】

一つの局面において、疾患は、急性骨髄性白血病（AML）のような白血病またはその合併症を含むが、これらに限定されるわけではない、血液がん、具体的には、幹細胞がんである。

【0389】

本発明は、患者におけるHSP70発現細胞の集団の増殖を阻害するかまたは活性を低下させるための方法において使用するための組成物も提供する。例示的な方法は、HSP70発現細胞を含む細胞の集団を、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、CARTと接触させる工程を含む。 40

【0390】

より具体的な局面において、本発明は、HSP70発現がん細胞集団を、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、CARTと接触させる工程を含む、患者におけるHSP70発現がん細胞の集団の増殖を阻害するかまたは低下させるための方法において使用するための組成物を提供し、本発明の抗HSP70 CAR細胞、具体的には、CARTの、HSP70発現がん細胞との結合は、HSP70発現がん細胞の破壊をもたらす。

【0391】

ある種の局面において、本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、CARTは、骨髄性白血 50

病または別のHSP70発現細胞に関連したがんを有する対象またはそれらの動物モデルにおいて、陰性対照と比べて、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも99%（検出不可能なレベルまで）細胞および/またはがん細胞の含量、数、量、または百分率を低下させる。

【0392】

本発明は、HSP70発現細胞に関連した（例えば、血液がんに関連した）障害または状態の防止、処置、および/または管理の方法において使用するための組成物も提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、CARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。一つの局面において、対象はヒトである。HSP70発現細胞に関連した障害の非限定的な例には、（慢性関節リウマチのような）炎症性障害および（血液がん、具体的には、AMLまたはAML合併症のような）がんが含まれる。

10

【0393】

本発明は、HSP70発現細胞に関連した疾患の防止、処置、および/または管理の方法において使用するための組成物も提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。一つの局面において、対象はヒトである。HSP70発現細胞に関連した疾患の非限定的な例には、具体的には、急性骨髄性白血病（AML）が含まれる。

【0394】

本発明は、HSP70発現細胞に関連したがんの再発の処置または防止の方法において使用するための組成物を提供し、該方法は、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、CARTを、その必要のある対象へ投与する工程を含む。別の局面において、方法は、有効量の別の治療と組み合わせて、HSP70発現細胞に結合する本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTを、有効量、その必要のある対象へ投与する工程を含む。

20

【0395】

一つの局面において、HSP70は、AMLにおける「がん幹細胞」マーカーであると見なされる。従って、本発明の抗HSP70 CART細胞、具体的には、scCARTは、AMLの再発を防止することができ、大部分がHSP70陰性であるが、HSP70+細胞（HSP70発現細胞）の「幹」集団を含むAMLを処置することすらできる。

30

【0396】

一つの局面において、本発明は、CD19の発現レベルの上昇に関連した疾患または障害のための処置を受けたことがあって、HSP70のレベルの上昇に関連した疾患または障害を示す対象を処置するための組成物および方法を提供する。

【0397】

本発明による操作された免疫細胞による処置は、抗体治療、化学療法、サイトカイン治療、樹状細胞治療、遺伝子治療、ホルモン治療、レーザー光線治療、および放射線治療の群より選択される、がんに対する1種以上の治療と組み合わせられてもよい。

【0398】

好ましくは、本発明による操作された免疫細胞による処置は、アラシチン、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミトキサントロン、ペプシド、エトポシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸の組み合わせ、メクロレタミン、プロカルバジン、クロラムブシル、およびそれらの組み合わせより選択される、がんに対する1種以上の治療と組み合わせ（例えば、その前に、それと同時に、またはその後）に投与され得る。

40

【0399】

本発明の好ましい態様によると、処置は、免疫抑制処置を受けている患者に施すことができる。実際、本発明は、好ましくは、そのような免疫抑制剤の受容体をコードする遺伝子の不活性化のため、少なくとも1種の免疫抑制剤に対して抵抗性にされた細胞または細胞の集団に依拠する。この局面において、免疫抑制処置は、患者における本発明によるT

50



細胞の選択および増加を支援するべきである。

【0400】

本発明による細胞または細胞の集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、経口、輸液、植え込み、または移植を含む、便利な様式で実施され得る。本明細書に記載された組成物は、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈注射もしくはリンパ内注射によって、または腹腔内に、患者へ投与され得る。一つの態様において、本発明の細胞組成物は、好ましくは、静脈注射によって投与される。

【0401】

細胞または細胞の集団の投与は、これらの範囲内の細胞数の全ての整数値を含む、体重1kg当たり $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞、好ましくは、体重1kg当たり $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞の投与からなり得る。細胞または細胞の集団は、単回投与されてもよくまたは複数回投与されてもよい。別の態様において、有効量の細胞が、単回投与される。別の態様において、有効量の細胞が、ある期間にわたり複数回投与される。投与のタイミングは、管理する医師の判断にあり、患者の臨床状態に依る。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーのような任意の起源から入手され得る。個々の必要性は変動するが、特定の疾患または状態のための所定の細胞型の有効量の最適範囲の決定は、当技術分野の技術の範囲内にある。有効量とは、治療的または予防的な利益を提供する量を意味する。投与される投薬量は、レシピエントの年齢、健康、および体重、もしあれば、同時処置の種類、処置の頻度、ならびに望まれる効果の性質に依存するであろう。

【0402】

別の態様において、有効量の細胞またはそれらの細胞を含む組成物は、非経口投与される。投与は、静脈内投与であり得る。投与は、腫瘍内への注射によって直接行われてもよい。

【0403】

本発明のある種の態様において、細胞は、抗ウイルス治療、シドホビル、およびインターロイキン2、シタラビン（ARA-Cとしても公知）のような薬剤による処置、またはMS患者のためのナタリズマブ処置、または乾癬患者のためのエファリズマブ処置、またはPML患者のためのその他の処置を含むが、これらに限定されない、多数の関連する処置モダリティと共に（例えば、前に、同時に、または後に）患者へ投与される。さらなる態様において、本発明のT細胞は、化学療法、放射線、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびFK506のような免疫抑制剤、抗体、またはCAMPATH、抗CD3抗体、もしくはその他の抗体治療のようなその他の免疫除去（immunoablative）剤、シトキシン（cytotoxin）、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、ならびに照射と組み合わせて使用されてもよい。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害するか（シクロスポリンおよびFK506）、または増殖因子によって誘導されるシグナリングにとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（ラパマイシン）（Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993）。

【0404】

さらなる態様において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビン、外部照射治療（XRT）、シクロホスファミドのような化学療法剤、またはOKT3もしくはCAMPATHのような抗体のいずれかを使用したT細胞除去治療と共に（例えば、前に、同時に、または後に）患者へ投与される。

【0405】

別の態様において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキシマンのようなB細胞除去治療の後に投与される。例えば、一つの態様において、対象は、高用量化学療法による標準的な処置を受けた後、末梢血幹細胞移植を受けることができる。ある種の態様において、移植の後、対象は、増加させた本発明の免疫細胞の注入を受ける。付加的な態様において、増加させた細胞は、手術の前または後に投与される。

【0406】

本発明のある種の態様において、抗HSP70 CAR発現細胞は、アラシチン、シトシンアラビノシド、アムサクリン、ダウノルビシン、イダルビシン、ノバントロン、ミトキサントロン、ペブシド、エトポシド（VP16）、亜ヒ酸、トランス型レチノイン酸、亜ヒ酸とトランス型レチノイン酸の組み合わせ、メクロレタミン、プロカルバジン、クロラムブシル、およびそれらの組み合わせより選択される薬物と共に（例えば、その前に、それと同時に、またはその後に）患者へ投与される。これらの態様において、抗HSP70 CAR発現細胞は、抗HSP70 CAR発現細胞と共に投与される特定の薬物または薬物の組み合わせに対して耐性であり得る。

#### 【0407】

本発明の他の態様において、抗HSP70 CAR発現細胞は、シタラビン、アントラサイクリン、6-チオグアニン、ヒドロキシ尿素、プレドニゾン、およびそれらの組み合わせより選択される薬物と共に患者へ投与される。

#### 【0408】

##### 他の定義

他に特記されない限り、「1つの（a）」、「1つの（an）」、「その（the）」、および「少なくとも1」は、交換可能に使用され、1または複数を意味する。ポリペプチド配列内のアミノ酸残基は、1文字コードによって本明細書において表記され、例えば、QはGln、すなわちグルタミン残基を意味し、RはArg、すなわちアルギニン残基を意味し、DはAsp、すなわちアスパラギン酸残基を意味する。

#### 【0409】

アミノ酸置換とは、あるアミノ酸残基の他のアミノ酸残基への交換を意味し、例えば、ペプチド配列内のアルギニン残基のグルタミン残基への交換は、アミノ酸置換である。

#### 【0410】

ヌクレオチドは以下のように表記される：1文字コードがヌクレオチドの塩基を表記するために使用される：Aはアデニンであり、Tはチミンであり、Cはシトシンであり、Gはグアニンである。縮重ヌクレオチドのため、rはgまたはa（プリンヌクレオチド）を表し、kはgまたはtを表し、sはgまたはcを表し、wはaまたはtを表し、mはaまたはcを表し、yはtまたはc（ピリミジンヌクレオチド）を表し、dはg、a、またはtを表し、vはg、a、またはcを表し、bはg、t、またはcを表し、hはa、t、またはcを表し、nはg、a、t、またはcを表す。

#### 【0411】

本明細書において使用されるように、「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）のようなヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成された断片、ならびにライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生成された断片をさす。核酸分子は、（DNAおよびRNAのような）天然に存在するヌクレオチド、または天然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、天然に存在するヌクレオチドの鏡像異性体）、または両方の組み合わせであるモノマーから構成され得る。修飾型ヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジン塩基部分もしくはプリン塩基部分に変化を有し得る。糖修飾には、例えば、1つ以上のヒドロキシル基のハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基への交換が含まれ、または糖がエーテルもしくはエステルとして官能化されていてもよい。さらに、糖部分全体が、アザ糖および炭素環式糖類似体のような立体的かつ電子的に類似した構造に交換されてもよい。塩基部分の修飾の例には、アルキル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンもしくはピリミジン、またはその他の周知の複素環式置換基が含まれる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体によって連結され得る。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。

#### 【0412】

「送達ベクター」とは、本発明において必要とされる薬剤/化学物質および分子（タンパク質または核酸）を、細胞と接触させるため（即ち、「接触」）、または細胞もしくはは

10

20

30

40

50

細胞内区画へ送達するため（即ち、「導入」）、本発明において使用され得る送達ベクターを表す。それには、リポソーム送達ベクター、ウイルス送達ベクター、薬物送達ベクター、化学的担体、ポリマー担体、リポプレックス、ポリプレックス、デンドリマー、微小気泡（超音波造影剤）、ナノ粒子、乳濁液、またはその他の適切な移入ベクターが含まれるが、これらに限定されない。これらの送達ベクターは、分子、化学物質、高分子（遺伝子、タンパク質）、またはプラスミド、Diatosによって開発されたペプチドのようなその他のベクターの送達を可能にする。これらのケースにおいて、送達ベクターは分子担体である。「送達ベクター」とは、トランスフェクションを実施するための送達方法も表す。

#### 【0413】

「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子をさす。本発明における「ベクター」には、ウイルスベクター、プラスミド、RNAベクター、または染色体核酸、非染色体核酸、半合成核酸、もしくは合成核酸からなり得る直鎖状もしくは環状のDNA分子もしくはRNA分子が含まれるが、これらに限定されない。好ましいベクターは、それらが連結された核酸の自律複製が可能なもの（エピソードベクター）および/または発現が可能なもの（発現ベクター）である。多数の適切なベクターが、当業者に公知であり、市販されている。

#### 【0414】

ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹およびセンダイ）のようなマイナス鎖RNAウイルス、ピコルナウイルスおよびアルファウイルスのようなプラス鎖RNAウイルス、ならびにアデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス）、およびボックスウイルス（例えば、ワクシニア、鶏痘、およびカナリアボックス）を含む二本鎖DNAウイルスが含まれる。他のウイルスには、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが含まれる。レトロウイルスの例には、トリ白血病肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが含まれる（Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B.N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996）。

#### 【0415】

「レンチウイルスベクター」とは、比較的大きいパッケージング能力、低下した免疫原性、および広範囲の異なる細胞型を高い効率で安定的に形質導入する能力のため、遺伝子送達のために極めて有望である、HIVに基づくレンチウイルスベクターを意味する。レンチウイルスベクターは通常、3種（パッケージング、エンベロープ、および移入）またはそれ以上のプラスミドを産生細胞に一過性トランスフェクションした後、生成される。HIVと同様に、レンチウイルスベクターは、ウイルス表面糖タンパク質の細胞表面上の受容体との相互作用を通して標的細胞に侵入する。侵入後、ウイルスRNAが、ウイルス逆転写酵素複合体によって媒介される逆転写を受ける。逆転写の産物は、感染細胞のDNAへのウイルス組み込みのための基質となる二本鎖の直鎖状ウイルスDNAである。「組み込みレンチウイルスベクター（またはLV）」とは、非限定的な例として、標的細胞のゲノムに組み込まれ得るそのようなベクターを意味する。反対に、「非組み込みレンチウイルスベクター（またはNILV）」とは、ウイルスインテグラーゼの作用を通して標的細胞のゲノムに組み込まれない効率的な遺伝子送達ベクターを意味する。

#### 【0416】

送達ベクターおよびベクターは、ソノポレーション（sonoporation）もしくは電気穿孔のような細胞透過処理技術、またはこれらの技術の変法と関連しているかまたは組み合わせられてよい。

#### 【0417】

10

20

30

40

50

細胞とは、真核生物の生存細胞、初代細胞、およびインビトロ培養のためのこれらの生物に由来する細胞株を表す。

【0418】

「初代細胞」とは、集団倍化をほとんど受けておらず、従って、腫瘍形成性の連続細胞株または人為的に不死化された細胞株と比較して、それが由来した組織の主な機能的成分および特徴をよりよく表している、生存組織（即ち、生検材料）から直接採取され、インビトロでの増殖のために確立された細胞を表す。

【0419】

非限定的な例として、細胞株は、CHO-K1細胞；HEK293細胞；Caco2細胞；U2-OS細胞；NIH 3T3細胞；NSO細胞；SP2細胞；CHO-S細胞；DG44細胞；K-562細胞、U-937細胞；MRC5細胞；IMR90細胞；ジャーカット細胞；HepG2細胞；HeLa細胞；HT-1080細胞；HCT-116細胞；Hu-h7細胞；Huvec細胞；Molt 4細胞からなる群より選択される。

10

【0420】

これらの細胞株は、全て、関心対象の遺伝子またはタンパク質を作製し、発現させ、定量化し、検出し、研究するための細胞株モデルを提供するため、本発明の方法によって改変され得；これらのモデルは、研究および作製、ならびに非限定的な例としての化学物質、生物燃料、治療薬、および農学のような様々な領域において、関心対象の生理活性分子をスクリーニングするためにも使用され得る。

【0421】

「変異」とは、ポリヌクレオチド（cDNA、遺伝子）またはポリペプチドの配列における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、30個、40個、50個、またはそれ以上までのヌクレオチド／アミノ酸の置換、欠失、挿入を表す。変異は、遺伝子のコード配列またはその制御配列に影響を与える場合がある。また、ゲノム配列の構造またはコードされたmRNAの構造／安定性に影響を与える場合もある。

20

【0422】

「バリエーション」とは、親分子のアミノ酸配列における少なくとも1個の残基の変異または交換によって入手されたリピートバリエーション、バリエーション、DNA結合バリエーション、TALEヌクレアーゼバリエーション、ポリペプチドバリエーションを表す。

【0423】

「機能的バリエーション」とは、タンパク質またはタンパク質ドメインの触媒活性変異体を表し；そのような変異体は、その親のタンパク質またはタンパク質ドメインと比較して、同一の活性、または付加的な特性、またはより高いかもしくはより低い活性を有し得る。

30

【0424】

「同一性」とは、2種の核酸分子またはポリペプチドの間の配列同一性をさす。同一性は、比較の目的のために整列化され得る各配列の位置を比較することによって決定され得る。比較された配列のある位置が同一の塩基によって占有される時、それらの分子はその位置において同一である。核酸またはアミノ酸配列の間の類似性または同一性の程度は、核酸配列が共有している位置における同一のまたは一致するヌクレオチドの数の関数である。GCG配列分析パッケージ（University of Wisconsin, Madison, Wis.）の一部として入手可能であるFASTAまたはBLASTを含む、様々なアライメントアルゴリズムおよび／またはプログラムが、2種の配列の間の同一性を計算するために使用され得、例えば、デフォルト設定で使用され得る。例えば、本明細書に記載された特定のポリペプチドと少なくとも70％、85％、90％、95％、98％、または99％の同一性を有しており、好ましくは、実質的に同一の機能を示すポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、企図される。

40

【0425】

「類似性」とは、2種以上のポリペプチドのアミノ酸配列の間の関係を記載する。BLAST Pも、BLOSUM45、BLOSUM62、またはBLOSUM80のような類似性マトリックスを使用して、参照アミノ酸配列と少なくとも70％、75％、80％、85％、87.5％、90％、92.5％、95％、97

50

.5%、98%、99%の配列類似性を有するアミノ酸配列を同定するために使用され得る。他に示されない限り、類似性スコアは、BLOSUM62の使用に基づくであろう。BLASTPが使用される時、パーセント類似性は、BLASTP陽性スコアに基づき、パーセント配列同一性は、BLASTP同一性スコアに基づく。BLASTP「同一性」は、同一である高スコア配列対における全残基の数および画分を示し；BLASTP「陽性」は、アライメントスコアが正の値を有しており、相互に類似している残基の数および画分を示す。本明細書に開示されたアミノ酸配列との同一性もしくは類似性のこれらの程度または同一性もしくは類似性の中間の程度を有するアミノ酸配列が、本開示によって企図され包含される。類似したポリペプチドのポリヌクレオチド配列は、遺伝暗号を使用して推定され、従来の手段によって入手され得る。例えば、pT の機能的バリエーションは、出願WO2013176916に開示されているSEQ ID NO: 107のアミノ酸配列と70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%の配列類似性を有し得る。そのような機能的バリエーションをコードするポリヌクレオチドは、遺伝暗号を使用して、そのアミノ酸配列を逆翻訳することによって作製されるであろう。

10

#### 【0426】

「対象」または「患者」という用語には、本明細書において使用されるように、非ヒト霊長類およびヒトを含む動物界の全てのメンバーが含まれる。

#### 【0427】

「再発」という用語は、治療後、がんの寛解を有していた対象または哺乳動物ががん細胞の復帰を有する状況をさす。

20

#### 【0428】

「難治性または耐性」という用語は、対象または哺乳動物が、集中的な処置の後ですら、体内に残存がん細胞を有する環境をさす。

#### 【0429】

「薬剤耐性」という用語は、疾患が薬物の処置に応答しない状態をさす。薬剤耐性は、内因性（もしくは一次耐性）（疾患が薬物に全く応答性ではないことを意味する）、または獲得型（二次耐性）（疾患が以前は応答した薬物に応答しなくなることを意味する）のいずれかであり得る。ある種の態様において、薬剤耐性は内因性である。ある種の態様において、薬剤耐性は獲得型である。

#### 【0430】

「血液悪性疾患」または「血液がん」という用語は、身体の血液-骨髄および/またはリンパ組織のがんをさす。血液悪性疾患の例には、特に急性骨髄白血病（AML）、三血球系骨髄異形成を伴うAML（AML/TMDS）、混合系統白血病（MLL）、および他のAM関連病状が含まれる。

30

#### 【0431】

「白血病」という用語は、造血組織の悪性新生物をさし、特に急性骨髄白血病または急性骨髄性白血病（AML）を含む。

#### 【0432】

上記の本発明の説明は、当業者が本発明を作製し使用することが可能になるよう、本発明を作製し使用する様式および過程を提供するものであり、この可能性は、当初明細書の一部を構成する添付の特許請求の範囲の主題のために特に提供される。

40

#### 【0433】

本明細書において数的な限度または範囲が記述される場合、その終点が含まれる。数的な限度または範囲に含まれる全ての値および部分範囲も、明示的に記載されたかのごとく、具体的に含まれる。

#### 【0434】

上記の説明は、当業者が本発明を作製し使用することを可能にするために提示され、特定の適用およびその必要条件に関して提供される。好ましい態様に対する様々な改変は、当業者に容易に明白になり、本明細書において定義された一般原理は、本発明の本旨および範囲から逸脱することなく、他の態様および適用に適用され得る。従って、本発明は、

50

示された態様に限定されず、本明細書に開示された原理および特色と一致する最も広い範囲を与えられるものとする。

#### 【0435】

本発明を全般的に説明したが、ある種の具体例を参照することによって、さらなる理解を得ることができる。それらの具体例は、例示目的のために本明細書に提供されるに過ぎず、他に特記されない限り、限定するためのものではない。

#### 【実施例】

#### 【0436】

##### 概略法

##### 初代T細胞培養物

10

フィコール勾配密度媒体を使用して、EFS (Etablissement Francais du Sang, Paris, France) によって提供されたパフィーコート試料から、T細胞を精製した。PBMC層を回収し、T細胞を市販されているT細胞濃縮キットを使用して精製した。精製されたT細胞を、20ng/mLヒトIL-2、5%ヒト、およびビーズ:細胞比1:1のDynabeads Human T activator CD3/CD28 (Life Technologies) が補足されたX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において活性化した。

#### 【0437】

##### scCAR mRNAトランスフェクション

T細胞の精製および活性化の後、4日目または11日目に、トランスフェクションを行った。5百万個の細胞に、異なるscCAR構築物をコードする15μgのmRNAをトランスフェクトした。最終体積200μlの「Cytoporation buffer T」(BTX Harvard Apparatus) において、0.4cmギャップキュベットにおいて、3000V/cmで0.1mSパルスで2回適用した後、325V/cmで0.2mSパルスを4回適用することによって、Cytopulseテクノロジーを使用して行われたT7 mRNAポリメラーゼトランスフェクションを使用して、scCAR mRNAを作製した。細胞をX-Vivo (商標) -15培地で直ちに希釈し、5%CO<sub>2</sub>と共に37℃でインキュベートした。IL-2を、20ng/mLで、電気穿孔の2時間後に添加した。

20

#### 【0438】

##### 脱顆粒アッセイ (CD107a動員)

96穴プレートにおいて、様々なレベルのHSP70タンパク質を発現する等量の細胞と共に、T細胞をインキュベートした (40,000細胞/ウェル)。共培養を、5%CO<sub>2</sub>で37℃で6時間、100μlの最終体積のX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において維持した。共培養の開始時に、1μg/mlの抗CD49d、1μg/mlの抗CD28、および1×モネンシン溶液と共に蛍光性抗CD107a抗体を添加することによって、細胞刺激中にCD107a染色を行った。6時間のインキュベーション期間の後、細胞を、固定可能な生死細胞判定色素および蛍光色素結合型抗CD8によって染色し、フローサイトメトリーによって分析した。CD8+/CD107a+細胞の%として、そしてCD8+細胞におけるCD107a染色についての平均蛍光強度シグナル (MFI) を決定することによって、脱顆粒活性を決定した。脱顆粒アッセイは、mRNAトランスフェクションの24時間後に実施された。

30

#### 【0439】

##### IFN 放出アッセイ

40

96穴プレートにおいて、様々なレベルのHSP70タンパク質を発現する細胞株と共に、T細胞をインキュベートした (40,000細胞/ウェル)。共培養を、5%CO<sub>2</sub>で37℃で24時間、100μlの最終体積のX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において維持した。このインキュベーション期間の後、プレートを5分間1500rpmで遠心分離し、上清を新しいプレートに回収した。細胞培養上清中のIFN 検出をELISAアッセイによって行った。IFN 放出アッセイは、mRNAトランスフェクションの24時間後に細胞共培養を始めることによって実施された。

#### 【0440】

##### 細胞傷害アッセイ

96穴プレートにおいて、同一のウェルにおいて、10,000個の標的細胞 (HSP70発現) および10,000個の対照細胞 (HSP70陰性) と共に、T細胞をインキュベートした (100,000細胞

50

胞/ウェル)。標的細胞および対照細胞は、scCAR+T細胞との共培養の前に、蛍光性の細胞内色素 (CFSEまたはCell Trace Violet) によって標識された。共培養物を5%CO<sub>2</sub>で37で4時間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、細胞を固定可能な生死細胞判定色素によって標識し、フローサイトメトリーによって分析した。各細胞集団 (標的細胞またはHSP70陰性対照細胞) の生存率を決定し、特異的細胞溶解の%を計算した。細胞傷害アッセイは、mRNAトランスフェクションの48時間後に実施された。

#### 【0441】

##### T細胞形質導入

scCARの発現のための組換えレンチウイルスベクターによるT細胞の形質導入を、T細胞精製/活性化の3日後に実施した。T細胞の表面のscCAR検出を、ヒトHSP70タンパク質の細胞外ドメインのマウスIgG1 Fc断片との融合からなる組換えタンパク質を使用して行った。このタンパク質のscCAR分子との結合を、タンパク質のマウスFc部分を標的とする蛍光色素結合型二次抗体によって検出し、フローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0442】

##### 抗腫瘍マウスモデル

AML異種移植片マウスモデルとして、免疫不全NOGマウスに、HSP70発現MOLM13-ルシフェラーゼ細胞を静脈内 (iv) 注射した。任意で、マウスは抗がん処置を受容した。次いで、異なる用量の試験されるscCAR+T細胞、またはscCARレンチウイルスベクターによって形質導入されていないT細胞を、(腫瘍細胞株の注射の2日後または7日後のいずれかに) マウスにiv注射した。異なる動物における腫瘍進行を追跡するため、T細胞注射の当日 (D0)、T細胞注射後7日目、14日目、21日目、28日目、および40日目に生物発光シグナルを決定した。

#### 【0443】

##### ウサギポリクローナル抗mHsp70.1抗体の作製

ウサギポリクローナル抗体作製のための標準的なウサギ免疫プロトコルは、以下のように実施され得る。コンジュゲートされていてもよいmHsp70.1抗原の調製は、0日目の前に行われる。コンジュゲートされたmHsp70.1ペプチド抗原のための注射量が与えられる。0.5mgの用量の抗原が、手法の全体において0.5mgで注射される。プロトコル日は大凡 (±2日) である。

#### 【0444】

10

20

30

手法	プロトコル 日	説明
対照血清収集	0日目	免疫前採血(ウサギ1匹当たり5mL)
初回注射	1日目	CFA(フロイント完全アジュバント)中の0.25mgの抗原による免疫、SQ、4箇所
1回目の追加免疫	14日目	不完全フロイントアジュバント(IFA)中の0.10mgの抗原による追加免疫、皮下(SQ)、4箇所
血清収集	28日目	採血(ウサギ1匹当たりおよそ25mL)
2回目の追加免疫	42日目	IFA中の0.10mgの抗原による追加免疫、SQ、4箇所
血清収集	56日目	採血(ウサギ1匹当たりおよそ25mL)
3回目の追加免疫	56日目	IFA中の0.10mgの抗原による追加免疫、SQ、4箇所
血清収集	70日目、 72日目	2回の採血(ウサギ1匹当たり合計およそ50mL)
ELISAおよび出荷	77日目	ELISA 滴定

10

20

30

## 【 0 4 4 5 】

マウスモノクローナル抗mHsp70.1抗体の作製

ウサギポリクローナル抗体作製のための標準的なウサギ免疫プロトコルは、以下のよう  
に実施され得る。初回注射および1回目の追加免疫注射は、フロイント完全アジュバント  
(CFA)または不完全フロイントアジュバント(IFA)によるエマルジョンとしてIPで行われ  
る；必要であれば、代替的なアジュバントが使用されてもよい。融合前の最終追加免疫  
は、腹腔内(IP)および静脈内(IV)である。完全な開発時間は、およそ4~6ヶ月である  
。初期ELISA滴定の結果によって、マウスは、融合のために必要な力価を生成するため、  
付加的な追加免疫および採血を必要とする場合がある。

## 【 0 4 4 6 】



手法	プロトコル日†	説明
対照血清収集	0日目	免疫前採血(マウス1匹当たり0.2~0.5mL)
初回注射	1日目	CFA中の0.1mgの抗原による免疫、IP
追加免疫注射	14日目、28日目	IFA中の0.1mgの抗原による追加免疫、IP
試験採血	42日目	試験採血(マウス1匹当たり0.2~0.5mL)
ELISA 滴定	43~60日目	免疫前採血および試験採血のELISA滴定； データ送達およびマウス選択
融合前の追加免疫	62日目	生理食塩水中の0.1mgの抗原による追加免疫、IP
融合前の追加免疫	64日目	生理食塩水中の0.1mgの抗原による追加免疫、IV
融合	66日目	骨髓腫細胞と脾細胞との融合
ELISA およびサブクローニング	80日目	クローンのスクリーニング、次いで、モノクローナル株を 確実にするためのサブクローニング
ELISA スクリーニング	94日目	クローンのスクリーニング、次いで、ストックの凍結； 評価のための上清の試験
増加	100日目	選択された親ストックの増加および凍結

10

20

30

40

50

## 【 0 4 4 7 】

実施例1：HSP70-scCARを発現するTCR 不活性化細胞の増殖

T細胞受容体 定常鎖領域 (TRAC) 遺伝子内の15bpスペーサーによって分離された2個の17bp長配列(半標的と呼ばれる)を標的とする異種二量体TALEヌクレアーゼを設計し作製した。各半標的は、表10にリストされた半TALEヌクレアーゼのリピートによって認識される。

## 【 0 4 4 8 】

(表10) TCR 遺伝子を標的とするTALヌクレアーゼ

標的	標的配列	リピート配列	半TALEヌクレアーゼ
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC Agaacctgacctg	リピートTRAC_T01-L (SEQ ID NO: 44)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 46)
	CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 43)	リピートTRAC_T01-R (SEQ ID NO: 45)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 47)

## 【 0 4 4 9 】

各TALEヌクレアーゼ構築物を、T7プロモーターの調節下で、制限酵素消化を使用して哺乳動物発現ベクターへサブクローニングした。TRACゲノム配列を切断するTALEヌクレアーゼをコードするmRNAを、T7プロモーターの下流にコード配列を保持しているプラスミドから合成した。

## 【 0 4 5 0 】

抗CD3/CD28によってコーティングされたビーズによって72時間予め活性化された精製されたT細胞に、両方の半TRAC\_T01 TALEヌクレアーゼをコードする2種のmRNAの各々をトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、同一のドナーに由来するT細胞の異なる群を、以前に記載された抗HSP70-scCAR (SEQ ID NO:21~32) のうちの1種をコードするレンチウイルスベクターによってそれぞれ形質導入した。形質導入の2日後、CD3陰性細胞を抗CD3磁気ビーズを使用して精製し、形質導入の5日後、細胞を可溶性抗CD28 (5 µg/ml) によって再活性化した。

#### 【0451】

週に2回、細胞を計数することによって、再活性化の30日後まで細胞増殖を追跡した。特に、抗CD28によって再活性化された時、非形質導入細胞と比較して、TCR 不活性化HSP 70 scCAR発現細胞の増殖の増加が観察された。 10

#### 【0452】

HSP70 scCAR発現ヒトT細胞が活性化状態を示すか否かを調査するため、活性化マーカーCD25の発現を、形質導入の7日後に、FACSによって分析する。HSP70 scCARをコードするレンチウイルスベクターによって形質導入された精製された細胞を、非形質導入細胞と比較して、活性化を査定するため、表面におけるCD25発現についてアッセイする。CD28再活性化条件または非再活性化条件の両方において、CD25発現の増加が予想される。

#### 【0453】

実施例2：様々な抗HSP70抗体断片を使用したHSP70 scCARの構築  
初代T細胞培養物 20

フィコール勾配密度媒体 (Ficoll Paque PLUS/GE Healthcare Life Sciences) を使用して、EFS (Etablissement Francais du Sang, Paris, France) によって提供されたパフィーコート試料から、T細胞を精製した。PBMC層を回収し、市販されているT細胞濃縮キット (Stem Cell Technologies) を使用して、T細胞を精製した。20ng/mLヒトIL-2 (Miltenyi Biotec)、5%ヒト血清 (Sera Laboratories)、およびビーズ:細胞比1:1のDynabeads Human T activator CD3/CD28 (Life Technologies) が補足されたX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において、精製されたT細胞を活性化した。活性化後、20ng/mLヒトIL-2 (Miltenyi Biotec) および5%ヒト血清 (Sera Laboratories) が補足されたX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において、細胞を増殖させ維持した。

#### 【0454】

scCAR mRNAトランスフェクション 30

T細胞の精製および活性化の後、4日目または11日目に、トランスフェクションを行った。5百万個の細胞に、異なるscCAR構築物をコードする15 µgのmRNAをトランスフェクトした。mMESSAGE mMACHINE T7キット (Life Technologies) を使用してscCAR mRNAを作製し、RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen) を使用して精製した。最終体積200 µlの「Cytoporation buffer T」 (BTX Harvard Apparatus) において、0.4cmギャップキュベットにおいて、3000V/cmで0.1mSパルスで2回適用した後、325V/cmで0.2mSパルスを4回適用することによって、Cytopulseテクノロジーを使用してトランスフェクションを行った。細胞をX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) で直ちに希釈し、5%CO<sub>2</sub>と共に37 °Cでインキュベートした。電気穿孔の2時間後に、20ng/mLのIL-2 (Miltenyi Biotec) を添加した。 40

#### 【0455】

脱顆粒アッセイ (CD107a動員)

96穴プレートにおいて、等量のHSP70タンパク質を発現する細胞または発現しない細胞と共に、T細胞をインキュベートした (40,000細胞/ウェル)。共培養を、5%CO<sub>2</sub>で37 °Cで6時間、100 µlの最終体積のX-Vivo (商標) -15培地 (Lonza) において維持した。共培養の開始時に、1 µg/mlの抗CD49d (BD Pharmingen)、1 µg/mlの抗CD28 (Miltenyi Biotec)、および1×モネンシン溶液 (eBioscience) と共に蛍光性抗CD107a抗体 (APC結合型、Miltenyi Biotec) を添加することによって、細胞刺激中にCD107a染色を行った。6時間のインキュベーション期間の後、細胞を、固定可能な生死細胞判定色素 (eFluor 780、eBioscience) および蛍光色素結合型抗CD8 (PE結合型、Miltenyi Biotec) によって染色し、 50

フローサイトメトリーによって分析した。CD8+/CD107a+細胞の%として、そしてCD8+細胞におけるCD107a染色についての平均蛍光強度シグナル(MFI)を決定することによって、脱顆粒活性を決定した。脱顆粒アッセイは、mRNAトランスフェクションの24時間後に実施された。

#### 【0456】

##### IFN 放出アッセイ

96穴プレートにおいて、HSP70タンパク質を発現する細胞株または発現しない細胞株と共に、T細胞をインキュベートした(40,000細胞/ウェル)。共培養を、5%CO<sub>2</sub>で37℃で24時間、100μlの最終体積のX-Vivo(商標)-15培地(Lonza)において維持した。このインキュベーション期間の後、プレートを5分間1500rpmで遠心分離し、上清を新しいプレートに回収した。細胞培養上清中のIFN 検出をELISAアッセイ(Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit、R&D Systems)によって行った。IFN 放出アッセイは、mRNAトランスフェクションの24時間後に細胞共培養を始めることによって実施された。

10

#### 【0457】

##### 細胞傷害アッセイ

96穴プレートにおいて、同一のウェルにおいて、10,000個の標的細胞(HSP70発現)および10,000個の対照細胞(HSP70陰性)と共に、T細胞をインキュベートした(100,000細胞/ウェル)。標的細胞および対照細胞は、scCAR+T細胞との共培養の前に蛍光性の細胞内色素(CFSEまたはCell Trace Violet、Life Technologies)によって標識された。共培養物を5%CO<sub>2</sub>で37℃で4時間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、細胞を固定可能な生死細胞判定色素(eFluor 780、eBioscience)によって標識し、フローサイトメトリーによって分析した。各細胞集団(標的細胞またはHSP70陰性対照細胞)の生存率を決定し、特異的細胞溶解の%を計算した。細胞傷害アッセイは、mRNAトランスフェクションの48時間後に実施された。

20

#### 【0458】

##### 例示的な抗HSP70単鎖キメラ抗原受容体

**マウス cmHsp70.1- sc CAR-v1** (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.21 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG]  
[GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDATAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS]GGGGSGGGGSG  
GGGS[QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK]  
[AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKR  
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVL  
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL  
PPR

10

**マウス cmHsp70.1- sc CAR-v2** (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.22 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG]  
[GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDATAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS]GGGGSGGGGSG  
GGGS[QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK]  
[AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]GLAVSTISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFLTIRFSVVK  
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVL  
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
LPPR

20

**マウス cmHsp70.1- sc CAR -v3** (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.23 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG]  
[GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDATAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS]GGGGSGGGGSG  
GGGS[QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK]  
[AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSA  
DAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

**マウス cmHsp70.1 sc CAR-v4** (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO. 24)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG]  
[GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDATAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS]GGGGSGGGGSG  
GGGS[QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK]  
[AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIISFFLALTSTALLFLLFLTIRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRS  
ADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
RRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

## マウス cmHsp70.1 sc CAR-v5 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.25 )

MALPVTALLPLALLLHAARP EVKLQESGPGLVAPSQSLSFTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG  
GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSG  
GGGS QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK  
AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIART  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM  
RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP  
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

## マウス cmHsp70.1- sc CAR-v6 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.26 )

MALPVTALLPLALLLHAARP EVKLQESGPGLVAPSQSLSFTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMWGG  
GSTDYNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYFCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSG  
GGGS QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDK  
AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIART  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG  
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

## ヒト cmHsp70.1 sc CAR-v1 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO. 27)

MALPVTALLPLALLLHAARP EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMWGG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSG  
GGGGS QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSL  
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL  
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR

30

## ヒ ト ヒ cmHsp70.1 sc CAR-v2 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.28 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGT[TTVTSS]GGGGSGGGGS  
GGGGS[QAVVTQEP[SLTVSPGGTVTLT]CRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLL  
GGKAALT[LSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]GLAVSTISSFFPPGYQISFFLALTSTALLFLLFFLTRF  
SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE  
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR

10

## ヒ ト ヒ cmHsp70.1 scCAR -v3 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.29 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGT[TTVTSS]GGGGSGGGGS  
GGGGS[QAVVTQEP[SLTVSPGGTVTLT]CRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLL  
GGKAALT[LSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]TTTPAPRPPTPAPT[IASQPLSLRPEACRPAAGGAV  
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK  
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  
KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

## ヒ ト ヒ cmHsp70.1 sc CAR-v4 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO. 30)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGT[TTVTSS]GGGGSGGGGS  
GGGGS[QAVVTQEP[SLTVSPGGTVTLT]CRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLL  
GGKAALT[LSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]TTTPAPRPPTPAPT[IASQPLSLRPEACRPAAGGAV  
HTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV  
KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG  
MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

## ヒ ト ヒ cmHsp70.1 sc CAR -v5 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.31 )

MALPVTALLPLALLHAARP[EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGT[TTVTSS]GGGGSGGGGS  
GGGGS[QAVVTQEP[SLTVSPGGTVTLT]CRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLL  
GGKAALT[LSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL  
MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV[FS]CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF  
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE  
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

ヒト化 cmHsp70.1 sc CAR-v6 (SEQ ID NO.1 + SEQ ID NO.32 )

MALPVTALLPLALLHAARP EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSRNSVHWVRQAPGKGLEWLGMIWG  
GGSTDYNSALKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGYDVFHYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGS  
GGGGS QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNNRAPWTPARFSGSLI  
GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL  
MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLFFLTFRFSVVKRGRKKLLYI  
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【 0 4 5 9 】

参考文献

Arbiza J., Taylor G., López J.A., Furze J., Wyld S., Whyte P., Stott E.J., Wertz G., Sullender W., Trudel M. , et al. (1992), Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.*;73 (9):2225-34).

Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* **26**(1): 324-33.

Atkins, J. F., N. M. Wills, et al. (2007). "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)." *Rna* **13**(6): 803-10.

10

Bardenheuer, W., K. Lehmborg, et al. (2005). "Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells." *Leukemia* **19**(12): 2281-8.

20

Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* **281**(1-2): 65-78.

Bierer, B. E., G. Hollander, et al. (1993). "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology." *Curr Opin Immunol* **5**(5): 763-73.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* **326**(5959): 1509-12.

30

Brewin, J., C. Mancao, et al. (2009). "Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease." *Blood* **114**(23): 4792-803.

Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1968-73.



Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* **186**(2): 757-61.

Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* **339**(6121): 819-23.

Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* **23**(10): 394-8.

Dasgupta, A., D. McCarty, et al. (2011). "Engineered drug-resistant immunocompetent cells enhance tumor cell killing during a chemotherapy challenge." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 170-5.

10

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. (2007) "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions." *FEBS Lett.* 31;581(19):3702-1

Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* **471**(7340): 602-7.

20

Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* **335**(6069): 720-3.

Domb A, Khan W, (2014) "Foc Focal Controlled Drug Delivery". *Advances in Delivery Science and Technology* .

Donnelly, M. and G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." *J Virol* **75**(6): 2566-74.

30

Doronina, V. A., C. Wu, et al. (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." *Mol Cell Biol* **28**(13): 4227-39.

Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* **33**(22): 7039-47.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." *Nature* **468**(7320): 67-71.

40

Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(39): E2579-86.

1999 Feb 1;

Gaudin C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F., 1999 "A *hsp70-2* mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma." J Immunol. 162(3):1730-8.

Geissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." PLoS One **6**(5): e19509.

Hacke, K., J. A. Treger, et al. (2013). "Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-thioguanine cytotoxicity." Transplant Proc **45**(5): 2040-4.

10

Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT, 1995 "Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry." ILAR J.37(3):93-118.

Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, Schmetzer H, Hiddemann W, Multhoff G., 2000, "Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients." Cell Stress Chaperones.5(5):438-42)

Hau J, Hendriksen CFM. 2005. Production of polyclonal antibodies: New technologies. ILAR J 46:294-299.

20

Henderson, D. J., I. Naya, et al. (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." Immunology **73**(3): 316-21.

Heck TG, Schöler CM, de Bittencourt PI., 2011, "HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? Cell Biochem Funct. 29(3):215-26.

30

Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." Nat Biotechnol **29**(8): 699-700.

Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood **116**(7): 1035-44.

Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-21.

40

Jonnalagadda, M., C. E. Brown, et al. (2013). "Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an in vivo cell selection strategy." PLoS One **8**(6): e65519.

Jakobsson M.E., Moen A., Bousset L., Egge-Jacobsen W., Kernstock S., Melki R., Falnes P.O., 2013, "*Identification and characterization of a novel human methyltransferase modulating Hsp70 function through lysine methylation.*" *J. Biol. Chem.* 288:27752-27763

Kabani M and Martineau C, 2008 "Multiple Hsp70 Isoforms in the Eukaryotic Cytosol: Mere Redundancy or Functional Specificity?" *Curr Genomics*. 9(5): 338–248.

Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* **1058**: 151-61.

10

Krause M, Heck TG, Bittencourt A, Pizzato Scmazzon S, Newsholme P, Curi R, Ivo P, Bittencourt H, 2015, "The Chaperone Balance Hypothesis: The Importance of the Extracellular to Intracellular HSP70 Ratio to Inflammation-Driven Type 2 Diabetes, the Effect of Exercise, and the Implications for Clinical Management", *Mediators of Inflammation*, Volume 2015, Article ID 249205, 12 pages

Kleijung T, Arndt O, Feldmann HJ, Bockmühl U, Gehrman M, Zilch T, Pfister K, Schönberger J, Marienhagen J, Eilles C, Rossbacher L, Multhoff G, 2003 « Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells", *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 57(3):820-6

20

Kushman, M. E., S. L. Kabler, et al. (2007). "Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1." *Carcinogenesis* **28**(1): 207-14.

30

Larsen HØ, Roug AS, Just T, Brown GD, Hokland P (2012), "Expression of the hMICL in acute myeloid leukemia-a highly reliable disease marker at diagnosis and during follow-up". *Cytometry B Clin Cytom.* 82(1):3-8).

Li, L., M. J. Piatek, et al. (2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification." *Plant Mol Biol* **78**(4-5): 407-16.

Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* **39**(1): 359-72.

40

Li, T., S. Huang, et al. (2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* **39**(14): 6315-25.

Liu, J., M. W. Albers, et al. (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." *Biochemistry* **31**(16): 3896-901.

Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8820-8.

Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." *Plant Mol Biol* **78**(3): 311-21. 10

Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(6): 2623-8.

Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." *Science* **335**(6069): 716-9.

Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." *Science* **339**(6121): 823-6. 20

McLaughlin P, et al. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 16(8):2825-33

Miller, J. C., S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* **29**(2): 143-8. 30

Morbitzer, R., P. Romer, et al. (2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(50): 21617-22.

Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* **326**(5959): 1501. 40

Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD, 1995, "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." *Int J Cancer.* 10;61(2):272-9.

Multhoff G. 2007 "Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance". *Methods*;43:229–237.

Multhoff G, Hightower LE, 2011 "Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies." *Cell Stress Chaperones*.16(3):251-255

Mussolino, C., R. Morbitzer, et al. (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." *Nucleic Acids Res* **39**(21): 9283-93.

10

Nivens, M. C., T. Felder, et al. (2004). "Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase." *Cancer Chemother Pharmacol* **53**(2): 107-15.

Paques, F. and P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." *Curr Gene Ther* **7**(1): 49-66.

20

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* **29**(11): 550-7.

Peipp, M., D. Saul, et al. (2004). "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications." *J Immunol Methods* **285**(2): 265-80.

Perrin, A., M. Buckle, et al. (1993). "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions." *Embo J* **12**(7): 2939-47.

30

Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." *Nat Biotechnol* **25**(7): 743-4.

Pockley A. G., Shepherd J., Corton J. M. (1998). Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol. Invest.* 27 367–377

Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." *Nat Biotechnol* **23**(8): 967-73.

Ravetch, J.V., Perussia, B., (1989). "Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions". *J. Exp. Med.* 170, 481–497.

40

Riemer A.B., Kurz H., Klinger, M., Scheiner, O., Zielinski, C., and Jensen-Jarolim, E. (2005), Vaccination with cetuximab mimotopes and biological properties of induced anti-epidermal growth factor receptor antibodies, J Natl Cancer Inst.;97(22):1663-70)

Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." *Mol Cell Biol* **14**(12): 8096-106.

Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." *Nat Biotechnol* **29**(8): 697-8.

10

Sangiolo, D., M. Lesnikova, et al. (2007). "Lentiviral vector conferring resistance to mycophenolate mofetil and sensitivity to ganciclovir for in vivo T-cell selection." *Gene Ther* **14**(21): 1549-54.

Schweitzer, B. I., A. P. Dicker, et al. (1990). "Dihydrofolate reductase as a therapeutic target." *Faseb J* **4**(8): 2441-52.

20

Sorek, R., C. M. Lawrence, et al. (2013). "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea." *Annu Rev Biochem.*

Stangl S, Gehrmann M, Riegger J, Kuhs K, Riederer I, Sievert W, Hube K, Mocikat R, Dressel R, Kremmer E, Pockley AG, Friedrich L, Vigh L, Skerra A, Multhoff G, 2011 "Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;108(2):733-8.

30

Steiner K, Graf M, Hecht K, Reif S, Roszbacher L, Pfister K, Kolb H.J, Schmetzer M and Multhoff G, 2006 "High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis" *Leukemia* **20**, 2076–2079

Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." *Q Rev Biophys* **38**(1): 49-95.

Sugimoto, Y., S. Tsukahara, et al. (2003). "Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91." *J Gene Med* **5**(5): 366-76.

40

Takebe, N., S. C. Zhao, et al. (2001). "Generation of dual resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide and methotrexate by retroviral transfer of the human aldehyde dehydrogenase class 1 gene and a mutated dihydrofolate reductase gene." *Mol Ther* **3**(1): 88-96.

Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." *Nat Biotechnol* **29**(8): 695-6.

Tamura Y, Tsuboi N, Sato N, Kikuchi K. 1993 "70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity". *J Immunol.*;151:5516–5524;

10

Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." *PLoS One* **6**(5): e19722.

White S, (2007) "Membrane Protein Insertion: The Biology–Physics Nexus", *J Gen Physiol.* 129(5): 363–369

20

Yam, P., M. Jensen, et al. (2006). "Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells." *Mol Ther* **14**(2): 236-44.

Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D. 2006 "Production of monoclonal antibodies." Curr Protoc Immunol. Chapter 2:Unit 2.5.

30

Zettlitz KA, Seitter J, Müller D, Kontermann, 2010 "Humanization of a mouse monoclonal antibody directed against a cell surface-exposed epitope of membrane-associated heat shock protein 70 (Hsp70)." RE Mol Biotechnol. 46(3):265-78)

Zhang Hongyong , Luo Juntao, Li Yuanpei, Henderson Paul T, Wachsmann-Hogiu Sebastian, Lam Kit S. , and Pan Chong-xian (2011) « Characterization of high-affinity peptides and their feasibility for use in nanotherapeutics targeting leukemia stem cells" Nanomedicine; 8(7): 1116–1124.

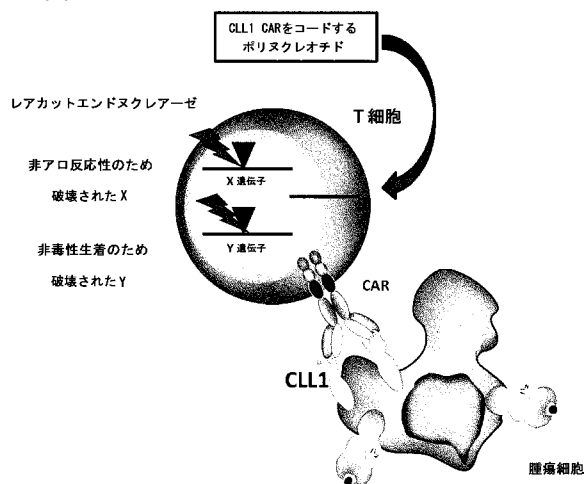
40

Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." Nat Biotechnol **29**(2): 149-53.

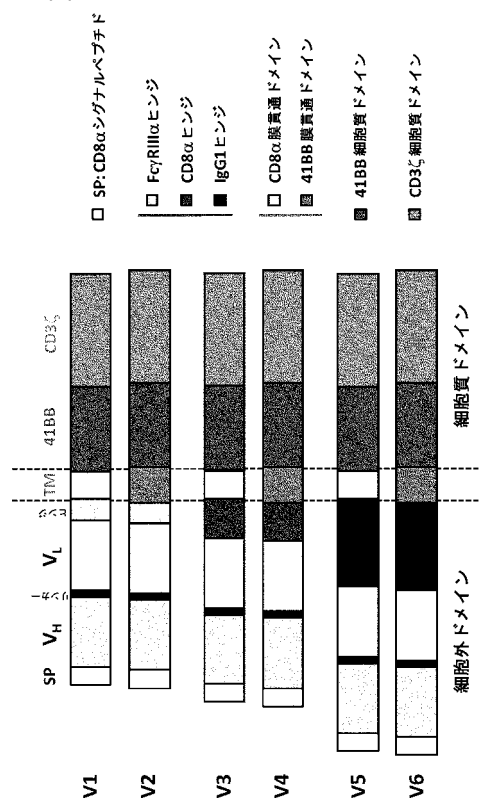
Zhang X, Xu Z, Zhou L, Chen Y, He M, Cheng L, Hu FB, Tanguay B and Wu T (2010) "Plasma levels of Hsp70 and anti-Hsp70 antibody predict risk of acute coronary syndrome" Cell Stress Chaperones. 15(5): 675–686.

Zielske, S. P., J. S. Reese, et al. (2003). "In vivo selection of MGMT(P140K) lentivirus-transduced human NOD/SCID repopulating cells without pretransplant irradiation conditioning." J Clin Invest 112(10):1561-70.

【 図 1 】

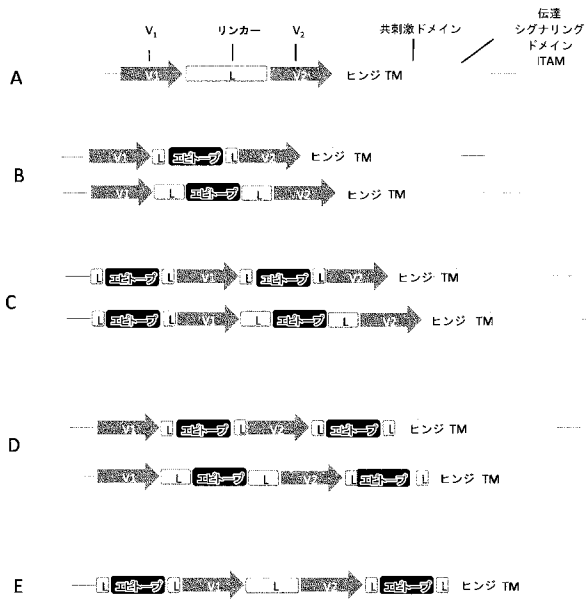


【 図 2 】

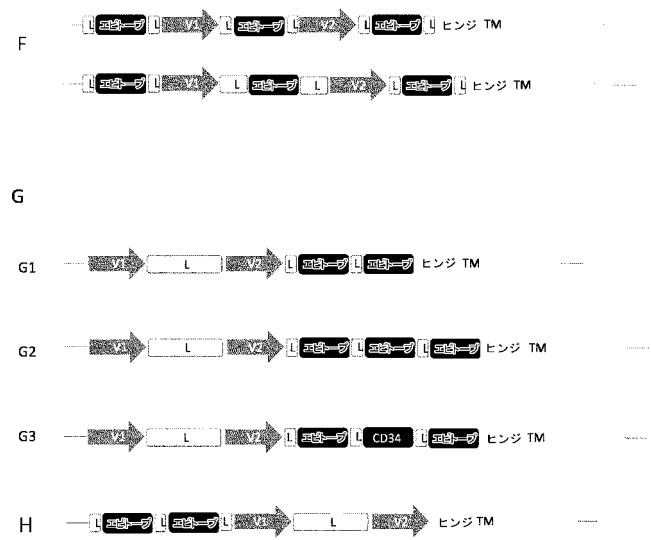




## 【図 3 A】



## 【図 3 B】



## 【配列表】

2018504143000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/051468

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051468

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395  
ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N

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

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2014/039523 A1 (COLLECTIS [FR]) 13 March 2014 (2014-03-13)	1,5-12, 14-17, 19-25, 29-52, 58-71
Y	page 14, paragraph 2 - page 47, last paragraph claims 1-26 figures 4A-4C  ----- -/--	2-4,13, 18, 26-28, 53-57

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

## \* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2016

Date of mailing of the international search report

13/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Ulbrecht, Matthias

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051468

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2014/100385 A1 (ANTHROGENESIS CORP [US]) 26 June 2014 (2014-06-26)	1,5-12, 14-17, 19-25, 29-52, 58-71
Y	paragraph [0113] paragraph [0135] - paragraph [0150] claims 1-80	2-4,13, 18, 26-28, 53-57
X	----- EP 2 765 193 A1 (UNIV MIE [JP]; TAKARA BIO INC [JP]) 13 August 2014 (2014-08-13)	1,5-12, 14-17, 19-25, 29-52, 58-71
Y	paragraph [0018] - paragraph [0055] figure 2	2-4,13, 18, 26-28, 53-57
Y	----- HROMADNIKOVA ILONA ET AL: "Expression of heat shock protein 70 and NKG2D ligands in acute myeloid leukemia cell lines", JOURNAL OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH, MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 30, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 161-169, XP009189266, ISSN: 1079-9893, DOI: 10.3109/10799891003671154 abstract	1-71
Y	----- K STEINER ET AL: "High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis", LEUKEMIA., vol. 20, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 2076-2079, XP55261081, US ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/sj.leu.2404391 the whole document ----- -/--	1-71

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/051468

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	S. STANGL ET AL: "Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 2, 11 January 2011 (2011-01-11), pages 733-738, XP55261079, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1016065108 abstract figure 4 -----	1-71
Y	GABRIELE MULTHOFF ET AL: "Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies", CELL STRESS AND CHAPERONES ; A COMPREHENSIVE JOURNAL OF STRESS BIOLOGY AND MEDICINE, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 16, no. 3, 17 December 2010 (2010-12-17), pages 251-255, XP019893946, ISSN: 1466-1268, DOI: 10.1007/S12192-010-0247-1 the whole document -----	1-71
Y	M. SADELAIN ET AL: "The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design", CANCER DISCOVERY, vol. 3, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 388-398, XP055133523, ISSN: 2159-8274, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548 the whole document -----	1-71
A	MARC CARTELLIERI ET AL: "A Novel Ex Vivo Isolation and Expansion Procedure for Chimeric Antigen Receptor Engrafted Human T Cells", PLOS ONE, vol. 9, no. 4, 3 April 2014 (2014-04-03), page e93745, XP055153686, DOI: 10.1371/journal.pone.0093745 abstract page 9, left-hand column, paragraph 4 - page 10, right-hand column, paragraph 3 figures 1-5 -----	1-71

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/051468

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014039523 A1	13-03-2014	AU	2013312838 A1	12-03-2015
		CA	2883502 A1	13-03-2014
		CN	104769103 A	08-07-2015
		EP	2893004 A1	15-07-2015
		JP	2015528298 A	28-09-2015
		KR	20150083991 A	21-07-2015
		SG	11201501471V A	30-03-2015
		WO	2014039523 A1	13-03-2014
-----				
WO 2014100385 A1	26-06-2014	AU	2013204922 A1	10-07-2014
		CA	2895840 A1	26-06-2014
		CN	105246912 A	13-01-2016
		EP	2935321 A1	28-10-2015
		JP	2016507499 A	10-03-2016
		KR	20150099576 A	31-08-2015
		SG	11201504855W A	30-07-2015
		US	2015307623 A1	29-10-2015
WO	2014100385 A1	26-06-2014		
-----				
EP 2765193 A1	13-08-2014	CN	104126009 A	29-10-2014
		EP	2765193 A1	13-08-2014
		JP	W02013051718 A1	30-03-2015
		KR	20140073531 A	16-06-2014
		US	2014242701 A1	28-08-2014
WO	2013051718 A1	11-04-2013		
-----				

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>1 2 1</b>	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 45/00</b>		
<b>A 6 1 K 35/12 (2015.01)</b>		<b>A 6 1 K 35/12</b>		
<b>A 6 1 K 35/26 (2015.01)</b>		<b>A 6 1 K 35/26</b>		

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

(74) 代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 スミス ジュリアン  
アメリカ合衆国 1 0 0 0 9 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト トウウェルフス ストリート 5 3 3 アpartment # 5 ディー

(72) 発明者 ヴァルトン ジュリアン  
アメリカ合衆国 1 0 0 0 9 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト トウウェルフス ストリート 5 3 3 アpartment # 5 ディー

(72) 発明者 ジュイレラット アレクサンドル  
アメリカ合衆国 1 0 0 2 8 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト エイティセカンド ストリート 4 4 4 # 5 エイ

(72) 発明者 ドゥシャトー フィリップ  
フランス共和国 9 1 2 1 0 ドラヴェイユ ケ デ ダームス バトー ファウエン

(72) 発明者 サス バーブラ ジョンソン  
アメリカ合衆国 9 4 1 1 0 カリフォルニア州 サンフランシスコ ブライアント ストリート 2 1 2 5 アpartment 3 1 6

(72) 発明者 ラジパール アルビンド  
アメリカ合衆国 9 4 1 2 7 カリフォルニア州 サンフランシスコ グランビル ウェー 1 5

0

F ターム(参考) 4B065 AA93X BA01 CA44

4C084 AA19 NA05 NA14 ZB261 ZB271 ZC75

4C087 AA01 AA03 BB64 BB65 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75

4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 BA19 CA40 DA50 EA22 FA74