

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-517889

(P2023-517889A)

(43)公表日 令和5年4月27日(2023.4.27)

| (51)国際特許分類 | | F I | | テーマコード(参考) | |
|------------|-----------------|---------|-------|------------|--------------------|
| C 1 2 N | 15/13 (2006.01) | C 1 2 N | 15/13 | | 4 B 0 6 4 |
| C 0 7 K | 16/30 (2006.01) | C 0 7 K | 16/30 | Z N A | 4 B 0 6 5 |
| C 0 7 K | 7/08 (2006.01) | C 0 7 K | 7/08 | | 4 C 0 8 5 |
| C 0 7 K | 7/06 (2006.01) | C 0 7 K | 7/06 | | 4 C 0 8 7 |
| C 0 7 K | 16/46 (2006.01) | C 0 7 K | 16/46 | | 4 H 0 4 5 |
| | | 審査請求 | 未請求 | 予備審査請求 | 未請求 (全148頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|-------------------|---|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願2022-553053(P2022-553053) | (71)出願人 | 596060697 マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ, マサチューセッツ ・アヴェニュー・7 7 |
| (86)(22)出願日 | 令和3年1月8日(2021.1.8) | (74)代理人 | 100092783 弁理士 小林 浩 |
| (85)翻訳文提出日 | 令和4年11月1日(2022.11.1) | (74)代理人 | 100095360 弁理士 片山 英二 |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2021/012701 | (74)代理人 | 100120134 弁理士 大森 規雄 |
| (87)国際公開番号 | WO2021/183207 | (72)発明者 | チェン, ジャンツ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 0, レキシントン, ワイマン 口 最終頁に続く |
| (87)国際公開日 | 令和3年9月16日(2021.9.16) | | |
| (31)優先権主張番号 | 62/987,612 | | |
| (32)優先日 | 令和2年3月10日(2020.3.10) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (81)指定国・地域 | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く | | |

(54)【発明の名称】 N P M 1 c 陽性がんの免疫療法のための組成物および方法

(57)【要約】

本開示は、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成しているか、もしくはそれによって提示される変異型ヌクレオフォスミン (NPM1c) のネオエピトープに結合する化合物 (例えば、抗体、その抗原結合断片、二重特異性分子、またはキメラ抗原受容体ポリペプチド)、またはそのような化合物を発現する細胞、および、がんの1つもしくは複数の症状を治療するか、もしくは寛解させるための方法におけるそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成した NPM 1 c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

(a) 前記 MHC クラス I タンパク質単独、および / または (b) 前記 MHC クラス I タンパク質と複合体を形成した対照ペプチドには結合しないか、または実質的に結合せず、任意選択で、前記対照ペプチドが NY - ESO - 1 エピトープまたはインフルエンザウイルス M1 エピトープである、請求項 1 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記 NPM 1 c ネオエピトープが、アミノ酸配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含み、式中、 X_1 は A、V、L または I から選択され、 X_2 は A、T、S、V、L、I、M または Q から選択され、 X_3 は Q または N から選択され、 X_4 は D または E から選択され、 X_5 は L、I、V、M、A または F から選択され、 X_6 は C、S、または A から選択され、 X_7 は L、I、V、M、A、または F から選択され、 X_8 は A、V、L または I から選択され、 X_9 は L、I、V、M または A から選択される、請求項 1 または 2 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

X_1 が A または V から選択され、 X_2 が V、I、または L から選択され、 X_3 が Q または N から選択され、 X_4 が D または E から選択され、 X_5 が L または I から選択され、 X_6 が C または S から選択され、 X_7 が V、L または I から選択され、 X_8 が A または V から選択され、 X_9 が V、I、または L から選択される、請求項 3 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

20

【請求項 5】

X_1 が A であり、 X_2 が V、I、または L から選択され、 X_3 が Q であり、 X_4 が D であり、 X_5 が L であり、 X_6 が C であり、 X_7 が L であり、 X_8 が A であり、 X_9 が V、I、または L から選択される、請求項 4 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記 NPM 1 c ネオエピトープが、AIQDLCLAV (配列番号 1) または AIQDLCLVAV (配列番号 71) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

30

【請求項 7】

前記 NPM 1 c ネオエピトープが、CLAVEEVSL (配列番号 72)、VEEVSLRK (配列番号 73)、AVEEVSLR (配列番号 74)、AVEEVSLRK (配列番号 75)、CLAVEEVSLRK (配列番号 76) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記ネオエピトープが、アミノ酸配列 AIQDLCLAV (配列番号 1) を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記ネオエピトープが、7、8、9、10、11、または 12 アミノ酸残基長である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

40

【請求項 10】

前記 MHC クラス I タンパク質が、HLA - A * 02 タンパク質であるか、または HLA - A * 02 アレルグループによってコードされる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

前記 MHC クラス I タンパク質が、HLA - A * 02 : 01 アレルによってコードされる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

50

(i) 重鎖可変領域 (V H) 相補性決定領域 (C D R) 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む V H であって、前記 V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 は、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V H の C D R である、V H、ならびに / または (i i) 軽鎖可変領域 (V L) 相補性決定領域 (C D R) 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む V L であって、前記 V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V L の C D R である、V L を含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 1 3】

重鎖可変領域 (V H) 相補性決定領域 (C D R) 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む V H を含み、前記 V H C D R 1 がアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 9) を有し、前記 V H C D R 2 がアミノ酸配列 I S G S G G S T (配列番号 1 0) を有し、前記 V H C D R 3 がアミノ酸配列 A R L G Y P T T T L L P F D Y (配列番号 1 1) を有する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

10

【請求項 1 4】

軽鎖可変領域 (V L) 相補性決定領域 (C D R) 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む V L をさらに含み、前記 V L C D R 1 がアミノ酸配列 Q S I S S Y (配列番号 6) を有し、前記 V L C D R 2 がアミノ酸配列 A A S (配列番号 7) を有し、前記 V L C D R 3 がアミノ酸配列 Q Q S Y S T P L T (配列番号 8) を有する、請求項 1 3 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

20

【請求項 1 5】

重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V H が、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一な、もしくは少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含み、ならびに / または前記 V L が、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一な、もしくは少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V H が配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、および / または前記 V L が配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

30

【請求項 1 7】

ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

単鎖 F v (s c F v)、F v 断片、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂断片、または単鎖抗体分子である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

s c F v である、請求項 1 8 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 2 0】

前記 s c F v がヒト s c F v である、請求項 1 9 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

40

【請求項 2 1】

前記 s c F v がリンカーを含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 2 2】

前記リンカーがペプチドリinkerである、請求項 2 1 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 2 3】

前記ペプチドリinkerが G l y - S e r リンカーである、請求項 2 2 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

50

【請求項 24】

前記 Gly - Ser リンカーが、(Gly 4 Ser) (配列番号 58)、(Gly 4 Ser)² (配列番号 59)、(Gly 4 Ser)³ (配列番号 60)、および (Gly 4 Ser)⁴ (配列番号 61) からなる群から選択される、請求項 23 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 25】

前記 Gly - Ser リンカーが、アミノ酸配列 S G S S G G S S S G (配列番号 4) を含む、請求項 23 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 26】

前記 s c F v が、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一な、少なくとも 85% 同一な、少なくとも 90% 同一な、または少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を有し、任意選択で、前記 s c F v が、(a) 重鎖可変領域 (V H) 相補性決定領域 (C D R) 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む V H であって、前記 V H C D R 1 はアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 9) を有し、前記 V H C D R 2 はアミノ酸配列 I S G S G G S T (配列番号 10) を有し、前記 V H C D R 3 はアミノ酸配列 A R L G Y P T T T L L P F D Y (配列番号 11) を有する、V H ; ならびに / または (b) 軽鎖可変領域 (V L) 相補性決定領域 (C D R) 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む V L であって、前記 V L C D R 1 はアミノ酸配列 Q S I S S Y (配列番号 6) を有し、前記 V L C D 2 はアミノ酸配列 A A S (配列番号 7) を有し、前記 V L C D 3 はアミノ酸配列 Q Q S Y S T P L T (配列番号 8) を有する、V L を含む、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

10

20

【請求項 27】

前記 s c F v が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 19 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 28】

抗体である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 29】

前記抗体が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、および I g E 抗体アイソタイプからなる群から選択される、請求項 28 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

30

【請求項 30】

前記抗体が、I g G 1 アイソタイプまたは I g G 4 アイソタイプのものである、請求項 29 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 31】

前記抗体が、野生型 I g G 1 重鎖定常領域または野生型 I g G 4 重鎖定常領域を含む、請求項 30 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 32】

前記抗体が、変異型 I g G 1 重鎖定常領域または変異型 I g G 4 重鎖定常領域を含む、請求項 30 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 33】

前記抗体が変異型 I g G 4 重鎖定常領域を含み、前記変異型 I g G 4 重鎖定常領域が、以下の置換：E U 番号付けによる S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、L 2 3 5 A のうちのいずれか 1 つ、またはそれらの組合せを含む、請求項 32 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

40

【請求項 34】

前記抗体が、少なくとも 1 つの変異を含む F c ドメインを含む、請求項 28 ~ 30、32 または 33 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 35】

前記抗原ががん細胞の表面にある、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

50

【請求項 36】

前記がんが急性骨髄性白血病（AML）である、請求項 35 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 37】

クラス I 主要組織適合複合体（MHC クラス I）タンパク質と複合体を形成した NPM1 cネオエピトープを含む抗原に、100 nM またはそれ未満、50 nM またはそれ未満、20 nM またはそれ未満、10 nM またはそれ未満、0.5 nM から 100 nM まで、または 1 nM から 15 nM までの平衡解離定数（Kd）で結合する、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 38】

免疫エフェクター細胞上の第 2 の抗原にさらに特異的に結合する二重特異性抗体、またはその抗原結合断片である、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 39】

前記エフェクター細胞が、T細胞、ナチュラルキラー細胞またはマクロファージである、請求項 38 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 40】

前記第 2 の抗原が CD3 である、請求項 38 または 39 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 41】

前記 CD3 が、T細胞上に発現されるヒト CD3 である、請求項 40 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 42】

前記第 2 の抗原が NKp46 である、請求項 38 または 39 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 43】

前記 NKp46 が、NK細胞上に発現されるヒト NKp46 である、請求項 42 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 44】

前記第 2 の抗原が CD16A である、請求項 38 または 39 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 45】

前記 CD16A が、NK細胞上に発現されるヒト CD16A である、請求項 44 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 46】

前記第 2 の抗原が、CD40、CD47、4-1BB、TGFB、LAG-3、PD-1、TIM-3、CTLA-4、OX40、NKp30、NKG2A、NKG2D または DNAM-1 である、請求項 38 または 39 に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 47】

精製されている、請求項 1～46 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 48】

単離された核酸であって、請求項 1～46 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片をコードする核酸配列を含む核酸。

【請求項 49】

配列番号 12 のヌクレオチド配列を含む、請求項 48 に記載の単離された核酸。

【請求項 50】

請求項 48 または 49 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 51】

請求項 50 に記載の発現ベクターによって形質転換された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

請求項 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片を作製するための方法であって、請求項 5 1 に記載の細胞を、前記抗体、またはその抗原結合断片の発現を可能にする条件下で維持するステップを含む方法。

【請求項 5 3】

前記抗体、またはその抗原結合断片を精製するステップをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片の治療有効量と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

10

【請求項 5 5】

細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチドであって、前記細胞外結合ドメインが、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成した NPM1c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する、CAR ポリペプチド。

【請求項 5 6】

細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチドであって、前記細胞外結合ドメインが、請求項 1 ~ 2 7 および 3 8 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその抗原結合断片を含む、CAR ポリペプチド。

20

【請求項 5 7】

前記膜貫通ドメインが、CD3 - ゼータ、CD8、CD28、NKG2D、CD16、NKp44 または NKp46 の膜貫通ドメインを含む、請求項 5 5 または 5 6 に記載の CAR ポリペプチド。

【請求項 5 8】

前記細胞内ドメインが、CD27、CD28、4 - 1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、2B4、DAP10、CD137 および DAP12 からなる群から選択される 1 つまたは複数の共刺激分子の 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含む、請求項 5 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチド。

【請求項 5 9】

前記細胞内ドメインが CD3 - ゼータシグナル伝達ドメインおよび 4 - 1BB 共刺激ドメインを含み、前記膜貫通ドメインが CD8 膜貫通ドメインを含み、前記 CAR ポリペプチドが CD8 ヒンジ領域をさらに含む、請求項 5 5 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチド。

30

【請求項 6 0】

前記細胞内ドメインが、配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列を含む CD3 - ゼータシグナル伝達ドメイン、および配列番号 2 6 に示されるアミノ酸配列を含む 4 - 1BB 共刺激ドメインを含み、前記 CAR ポリペプチドが CD8 膜貫通ドメインおよび CD8 ヒンジ領域を含み、前記 CD8 膜貫通ドメインおよび CD8 ヒンジ領域が、配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を含み、前記細胞外結合ドメインが、前記抗体、またはその抗原結合断片、および配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を含むリーディング配列を含む、請求項 5 5 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチド。

40

【請求項 6 1】

前記抗体、またはその抗原結合断片が、前記細胞外結合ドメインにおいて、配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列、または配列番号 2 4 のアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一な、少なくとも 75 % 同一な、少なくとも 80 % 同一な、少なくとも 85 % 同一な、少なくとも 90 % 同一な、もしくは少なくとも 95 % 同一なアミノ酸配列を含む scFv である、請求項 5 5 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチド。

【請求項 6 2】

前記細胞内ドメインが、自己切断性ペプチド配列およびサイトカインをさらに含み、自

50

己切断性ペプチドの切断により前記サイトカインが放出される、請求項 55 ~ 61 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチド。

【請求項 63】

前記サイトカインが、IL - 12、IL - 7、IL - 13、IL - 15、TNF - 、IFN - 、または CCL 19 である、請求項 62 に記載の CAR ポリペプチド。

【請求項 64】

配列番号 22 に示されるアミノ酸配列、または配列番号 22 のアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一な、少なくとも 75 % 同一な、少なくとも 80 % 同一な、少なくとも 85 % 同一な、少なくとも 90 % 同一な、もしくは少なくとも 95 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 55 または 56 に記載の CAR ポリペプチド。

10

【請求項 65】

請求項 55 ~ 64 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 66】

配列番号 30 のヌクレオチド配列、または配列番号 30 のヌクレオチド配列と少なくとも 70 % 同一な、少なくとも 75 % 同一な、少なくとも 80 % 同一な、少なくとも 85 % 同一な、少なくとも 90 % 同一な、もしくは少なくとも 95 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 65 に記載の単離された核酸。

【請求項 67】

請求項 65 または 66 に記載の単離された核酸を含む発現ベクターであって、ウイルス発現ベクターまたは非ウイルス性発現ベクターである発現ベクター。

20

【請求項 68】

前記発現ベクターがウイルス発現ベクターであり、前記ウイルス発現ベクターがレンチウイルス発現ベクターである、請求項 67 に記載の発現ベクター。

【請求項 69】

請求項 67 または 68 に記載の発現ベクターによって形質転換された細胞。

【請求項 70】

請求項 55 ~ 64 のいずれか一項に記載の CAR ポリペプチドを発現する細胞。

【請求項 71】

前記細胞が免疫エフェクター細胞であり、前記 CAR ポリペプチドの発現が、前記免疫エフェクター細胞を、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成した NPM1c ネオエピトープを含む抗原を発現するがん細胞に標的化させる、請求項 69 または 70 に記載の細胞。

30

【請求項 72】

前記 MHC クラス I タンパク質が、HLA - A * 02 タンパク質であるか、または HLA - A * 02 アレルグループによってコードされる、請求項 71 に記載の細胞。

【請求項 73】

前記免疫エフェクター細胞が、野生型 NPM1 を発現するがん細胞を実質的に標的とし、および / またはその殺滅を誘導する、請求項 71 または 72 に記載の細胞。

【請求項 74】

前記細胞が T 細胞である、請求項 69 ~ 73 のいずれか一項に記載の細胞。

40

【請求項 75】

前記 T 細胞がヒト CD8⁺ T 細胞である、請求項 74 に記載の細胞。

【請求項 76】

前記細胞がナチュラルキラー (NK) 細胞である、請求項 69 ~ 73 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 77】

前記細胞がマクロファージである、請求項 69 ~ 73 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 78】

前記がん細胞が急性骨髄性白血病 (AML) 細胞である、請求項 71 ~ 77 のいずれか

50

一項に記載の細胞。

【請求項 79】

請求項 69 ~ 78 のいずれか一項に記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 80】

請求項 69 ~ 78 のいずれか一項に記載の細胞を作製するための方法であって、

(i) 対象の末梢血単核細胞 (P M B C) から細胞を精製するステップ、

(ii) 任意選択で、前記細胞を、抗 C D 3 抗体もしくはその抗原結合断片および / または抗 C D 2 8 抗体もしくはその抗原結合断片によって活性化するステップ、

(iii) 請求項 67 または 68 に記載の発現ベクターによって前記細胞に形質導入するステップ、 10

(iv) 前記 C A R ポリペプチドを発現する前記細胞を単離するステップ、ならびに

(v) 任意選択で、前記単離された細胞を増大させるステップ

を含む方法。

【請求項 81】

請求項 69 ~ 78 のいずれか一項に記載の細胞を作製するための方法であって、

(i) 多能性幹細胞 (i P S C) を誘導して、免疫エフェクター細胞に分化させるステップ、

(ii) 請求項 67 または 68 に記載の発現ベクターによって前記免疫エフェクター細胞に形質導入するステップ、 20

(iii) 前記 C A R ポリペプチドを発現する前記免疫エフェクター細胞を単離するステップ、および

(iv) 任意選択で、前記単離された免疫エフェクター細胞を増大させるステップを含む方法。

【請求項 82】

前記免疫エフェクター細胞が N K 細胞である、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記免疫エフェクター細胞がマクロファージである、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

がんの治療を必要とする対象においてがんを治療する方法であって、前記がんを含む細胞の細胞表面が、クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを提示し、前記方法が、請求項 1 ~ 47 のいずれか一項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 69 ~ 78 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 54 もしくは 79 に記載の医薬組成物を、前記がんを治療するのに十分な量で前記対象に投与するステップを含む、方法。 30

【請求項 85】

前記がんが急性骨髄性白血病 (A M L) である、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

がんを治療する前記方法が、がんの量を減少させる方法、または前記対象における生存期間を延長させる方法である、請求項 84 または 85 に記載の方法。 40

【請求項 87】

急性骨髄性白血病 (A M L) の治療を必要とする対象において A M L を治療する方法であって、請求項 1 ~ 47 のいずれか一項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 69 ~ 78 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 54 もしくは 79 に記載の医薬組成物を、前記 A M L を治療するのに十分な量で前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 88】

前記 A M L が、再発性 A M L または難治性 A M L である、請求項 85 ~ 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

A M L から寛解している対象において A M L の再発を予防する方法であって、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 6 9 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 5 4 もしくは 7 9 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 9 0】

前記投与のステップの前に、前記対象が N P M 1 c を発現するか否か、または前記対象が N P M 1 遺伝子における N P M 1 c 変異を有するか否かを検出し、前記対象が N P M 1 c を発現するかまたは N P M 1 c 変異を有する場合、前記投与のステップに進むステップを含む、請求項 8 4 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記投与が、静脈内、髄腔内、骨内、または脊髄内である、請求項 8 4 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

1 つまたは複数の追加の治療薬または手順を投与するステップをさらに含む、請求項 8 4 ~ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記追加の治療薬が、免疫チェックポイント分子の阻害剤であり、任意選択で、前記免疫チェックポイント分子が、T I M - 3、P D - 1、P D - L 1 または C T L A - 4 であり、任意選択で、前記阻害剤が抗体である、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

対象におけるがんを治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の C A R ポリペプチド、請求項 6 9 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 5 4 もしくは 7 9 に記載の医薬組成物の使用であって、前記がんを含む細胞の細胞表面が、クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを提示し；任意選択で、前記使用が、1 つまたは複数の追加の治療薬または手順と組み合わせられたものである、使用。

【請求項 9 5】

前記対象がヒトである、請求項 8 4 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 9 4 に記載の使用。

【請求項 9 6】

(i) 請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の C A R ポリペプチド、請求項 6 9 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 5 4 もしくは 7 9 に記載の医薬組成物；(i i) 任意選択で、1 つまたは複数の追加の治療薬、および(i i i) 対象におけるがんの治療に使用するための説明書を含む 1 つまたは複数の容器を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の実施権の記載

本発明は、米国国立衛生研究所 (N I H) によって授与された助成金番号 C A 1 9 7 6 0 5 に基づき、政府の支援を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年3月10日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 9 8 7 , 6 1 2 号明細書の利益を主張する。その内容はすべて、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

細胞ベースの免疫療法が、がんの治療のために開発中である。T細胞、単球由来細胞 (

10

20

30

40

50

例えば、マクロファージ、樹状細胞)およびナチュラルキラー(NK)細胞の養子細胞移入を使用するアプローチが、がん治療として検討されている(例えば、Andreesen, R. et al (1990) *Cancer Res* 50:7450-7456; Ruggeri, L. et al (2002) *Science* 295:2097-2100; Rezvani, K. (2019) *Bone Marrow Transplantation* 54:785-788を参照)。具体的には、*ex vivo*で活性化/増大させたT細胞を患者に投与する養子細胞療法(ACIT)は、現在試験されているがん治療の1つである。(Rosenberg et al. (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4): 299; Dudley et al. (2002) *Science* 298(5594): 850; June et al. (2007) *J Clin Invest* 117(5): 1204; Stephan et al. (2007) *Nat Med* 13(12): 1440; Yee et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16168)。これらのアプローチは、患者から採取され、*ex vivo*で活性化/増大されて、次いで腫瘍、例えば、転移性腫瘍と闘うために再注入される自己T細胞の使用を伴う。ACIT T細胞の持続性、*in vivo*増大、およびエフェクター機能を増強する戦略が、客観的奏効の頻度を高めるために使用されてきた。(Rosenberg SA et al. (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4): 299; June CH et al. (2007) *J Clin Invest* 117(5): 1204)。ACIT T細胞の機能を増強する1つの方法は、例えば、キメラ受容体または共刺激分子を導入することによって、細胞それ自体の遺伝子操作を介する方法である(例えば、Stephan et al. (2007) *Nat Med* 13(12): 1440; Morgan et al. (2006) *Science* 314(5796): 126; Gade et al. (2005) *Cancer Res* 65(19): 9080を参照)。

10

【0004】

20

キメラ抗原受容体(CAR)T細胞治療は、がん治療のための戦略の1つとして登場してきた。キメラ抗原受容体(CAR)は、抗原(例えば、リガンド)に対する規定された特異性を免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、ナチュラルキラー細胞または他の免疫細胞)に付与して、抗原を認識してそれに結合した際にエフェクター細胞の活性化をもたらす、遺伝子操作された人工膜貫通受容体である。典型的には、これらのキメラ受容体は、モノクローナル抗体の抗原特異性を、当技術分野でCAR T細胞と称されるT細胞に与えるために使用される。CAR T細胞の表面上での操作されたキメラ抗原受容体の発現により、キメラ受容体によって認識される特定の抗原の表面発現を有する任意の標的細胞を溶解させる能力が、T細胞に付与される。

【0005】

30

しかし、細胞系譜限定的な抗原または腫瘍関連抗原(TAA)を標的とする現在のCARは、正常組織で低い抗原発現があるため、強い毒性を伴う可能性がある(Coulie et al., *NAT REV CANCER* 14: 135 (2014); Srivastava & Riddell, *J IMMUNOL* 200: 459 (2018)を参照)。さらに、TAAは腫瘍細胞の生存には必要ではないため、TAA発現の喪失は、CAR-T療法に対する腫瘍抵抗性の発生の主な原因となる(Srivastava & Riddell, *J IMMUNOL* 200: 459 (2018)を参照)。ネオ抗原は腫瘍特異的な遺伝子変異に由来し、その形成および発現は悪性細胞に限定される(Blankenstein et al., *CURR OPIN IMMUNOL* 33 112 (2015); Schumacher et al. *SCIENCE* 348: 69 (2015); van der Lee et al., *J CLIN INVEST* 129: 774 (2019)を参照)。しかし、ネオ抗原の大多数は、免疫編集が原因で失われて腫瘍免疫回避をもたらす可能性のある、患者に特異的なパッセンジャー変異によってコードされている(Verdegaal et al., *NATURE* 536: 91 (2016)を参照)。加えて、現行のCARは、主として標的細胞の表面にある抗原に結合するように設計されている。実際には、変異遺伝子由来の大部分のタンパク質は細胞内で発現され、そのため、従来のCARの標的としては利用できない(Uhlen et al., *SCIENCE* 347: 1260419 (2015)を参照)。

40

【0006】

急性骨髄性白血病(AML)に対するがん免疫療法の適用は限られている。AMLは急速に進行する造血器悪性腫瘍の1つであり、骨髄内で分化が停止した悪性骨髄系前駆細胞の蓄積によって特徴付けられる(van der Lee et al., *J CLIN INVEST* 129: 774 (2019); Thomas et al., *BLOOD* 129: 1577 (2017)を参照)。AMLに対する現

50

行の標準治療は、強力な化学療法および自己性または同種性造血幹細胞移植 (a l l o S C T) に依然として依拠している (Dombret & Gardin, BLOOD 127: 53 (2016); Dohner et al., N Engl J Med 373: 1136 (2015)を参照)。大部分の患者は標準治療に反応して完全寛解を達成することができるが、これらの患者の約50%に再発が起こる (Ossenkoppelle et al., HAEMATOLOGICA 101 20 (2016)を参照)。強力な化学療法または a l l o S C T の後の再発性または難治性 A M L 患者は通常、予後が非常に不良であり (van der Lee et al., J CLIN INVEST 129: 774 (2019)を参照)、このため、これらの患者に対する新しく効果的で毒性の少ない治療法を開発することには、大きな需要がある。

【発明の概要】

【0007】

一部の態様では、本開示は、クラスI主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0008】

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、(a) M H C クラス I タンパク質単独、および/または (b) M H C クラス I タンパク質と複合体を形成した対照ペプチドには結合しないか、または実質的に結合せず、任意選択で、対照ペプチドは、N Y - E S O - 1 エピトープまたはインフルエンザウイルス M 1 エピトープである。

【0009】

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、(a) M H C クラス I タンパク質単独、および (b) M H C クラス I タンパク質と複合体を形成した対照ペプチドには結合しないか、または実質的に結合せず、任意選択で、対照ペプチドは、N Y - E S O - 1 エピトープまたはインフルエンザウイルス M 1 エピトープである。

【0010】

一部の態様では、抗体、またはその抗原結合断片は、(a) M H C クラス I タンパク質単独、(b) M H C クラス I タンパク質と複合体を形成した対照ペプチド、任意選択で、対照ペプチドは N Y - E S O - 1 エピトープもしくはインフルエンザウイルス M 1 エピトープである、および/または (c) N P M 1 c ネオエピトープ単独には結合しないか、または実質的に結合しない。

【0011】

一部の態様では、抗体、またはその抗原結合断片は、(a) M H C クラス I タンパク質単独、(b) M H C クラス I タンパク質と複合体を形成した対照ペプチド、任意選択で、対照ペプチドは N Y - E S O - 1 エピトープもしくはインフルエンザウイルス M 1 エピトープである、および (c) N P M 1 c ネオエピトープ単独には結合しないか、または実質的に結合しない。

【0012】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、N P M 1 c ネオエピトープは、アミノ酸配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含み、式中、 X_1 は A、V、L または I から選択され、 X_2 は A、T、S、V、L、I、M または Q から選択され、 X_3 は Q または N から選択され、 X_4 は D または E から選択され、 X_5 は L、I、V、M、A または F から選択され、 X_6 は C、S、または A から選択され、 X_7 は L、I、V、M、A、または F から選択され、 X_8 は A、V、L または I から選択され、 X_9 は L、I、V、M または A から選択される。一部の態様では、N P M 1 c ネオエピトープは、アミノ酸配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含み、式中、 X_1 は A または V から選択され、 X_2 は V、I、または L から選択され、 X_3 は Q または N から選択され、 X_4 は D または E から選択され、 X_5 は L または I から選択され、 X_6 は C または S から選択され、 X_7 は V、L または I から選択され、 X_8 は A または V から選択され、 X_9 は V、I、または L から選択される。一部の態様では、N P M 1 c ネオエピトープは、アミノ酸配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ を含み、式中、 X_1 は A であり、 X_2 は V、I、または L から

10

20

30

40

50

選択され、 X_3 はQであり、 X_4 はDであり、 X_5 はLであり、 X_6 はCであり、 X_7 はLであり、 X_8 はAであり、 X_9 はV、I、またはLから選択される。一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、10、15、20、30、40、50または100アミノ酸残基長のペプチド内にある。

【0013】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、NPM1cネオエピトープは、AIQDLCLAV（配列番号1）またはAIQDLCLVAV（配列番号71）から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、CLAVEEVSL（配列番号72）、VEEVSLRK（配列番号73）、AVEEVSLR（配列番号74）、AVEEVSLRK（配列番号75）、CLAVEEVSLRK（配列番号76）から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列AIQDLCLAV（配列番号1）を含む。

10

【0014】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、NPM1cネオエピトープは、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸残基長である。

【0015】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A*02タンパク質であるか、またはHLA-A*02アレルグループによってコードされる。一部の態様では、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A*02:01アレルによってコードされる。

20

【0016】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、

(i) 重鎖可変領域(VH)相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2およびVH CDR3を含むVHであって、前記VH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3は、配列番号5のアミノ酸配列を有するVHのCDRであり、CDRはIMGTによって定義される通りである、VH；ならびに/または

(ii) 軽鎖可変領域(VL)相補性決定領域(CDR)1、VL CDR2およびVL CDR3を含むVLであって、前記VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3は、配列番号3のアミノ酸配列を有するVLのCDRであり、CDRはIMGTによって定義される通りである、VL

30

を含む抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0017】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、重鎖可変領域(VH)相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2およびVH CDR3を含むVHであって、VH CDR1はアミノ酸配列GFTFSSYA（配列番号9）を有し、VH CDR2はアミノ酸配列ISGSGGST（配列番号10）を有し、VH CDR3はアミノ酸配列ARLGYP T T T L L P F D Y（配列番号11）を有する、VHを含む抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0018】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、軽鎖可変領域(VL)相補性決定領域(CDR)1、VL CDR2およびVL CDR3を含むVLであって、VL CDR1はアミノ酸配列QSISSY（配列番号6）を有し、VL CDR2はアミノ酸配列AAS（配列番号7）を有し、VL CDR3はアミノ酸配列QQSYSTPLT（配列番号8）を有する、VLをさらに含む抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

40

【0019】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む抗体、またはその抗原結合断片であって、VHは、配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも90%同一な、もしくは少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含み、および/またはVLは、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも90

50

%同一な、もしくは少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む、抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0020】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む抗体、またはその抗原結合断片であって、VHは配列番号5のアミノ酸配列を含み、および/またはVLは配列番号3のアミノ酸配列を含む、抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0021】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0022】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、単鎖Fv(scFv)、Fv断片、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、または単鎖抗体分子である抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【0023】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、scFvである抗体、またはその抗原結合断片を提供する。一部の態様では、scFvはヒトscFvである。一部の態様では、scFvはリンカーを含む。一部の態様では、リンカーはペプチドリンカーである。一部の態様では、ペプチドリンカーはGly-Serリンカーである。一部の態様では、Gly-Serリンカーは、(Gly4Ser)(配列番号58)、(Gly4Ser)₂(配列番号59)、(Gly4Ser)₃(配列番号60)、および(Gly4Ser)₄(配列番号61)からなる群から選択される。一部の態様では、Gly-Serリンカーは、アミノ酸配列SGSSGGSSSG(配列番号4)を含む。

【0024】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、scFvは、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも80%同一な、少なくとも85%同一な、少なくとも90%同一な、または少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有し、任意選択で、scFvは、(a)重鎖可変領域(VH)相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2およびVH CDR3を含むVHであって、VH CDR1はアミノ酸配列GFTFSYA(配列番号9)を有し、VH CDR2はアミノ酸配列ISGSGGST(配列番号10)を有し、VH CDR3はアミノ酸配列ARLGYP T T L L P F D Y(配列番号11)を有する、VH; および/または(b)軽鎖可変領域(VL)相補性決定領域(CDR)1、VL CDR2およびVL CDR3を含むVLであって、VL CDR1はアミノ酸配列QSSISSY(配列番号6)を有し、VL CDR2はアミノ酸配列AAS(配列番号7)を有し、VL CDR3はアミノ酸配列QQSYSTPLT(配列番号8)を有する、VLを含む。

【0025】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、scFvは配列番号2のアミノ酸配列を有する。

【0026】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、抗体である抗体、またはその抗原結合断片を提供する。一部の態様では、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgE抗体アイソタイプからなる群から選択される。一部の態様では、抗体は、IgG1アイソタイプまたはIgG4アイソタイプのものである。一部の態様では、抗体は、野生型IgG1重鎖定常領域または野生型IgG4重鎖定常領域を含む。一部の態様では、抗体は、変異型IgG1重鎖定常領域または変異型IgG4重鎖定常領域を含む。

【0027】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、抗体は変異型IgG4重鎖定常領域を含み、変異型IgG4重鎖定常領域は、以下の置換のうちのいずれか1つを含む: EU番号付けによるS228P、L235E、L235A、またはそれらの組合せ。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、抗体は、少なくとも1つの変異を含むFcドメインを含む。

【 0 0 2 9 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、抗原は、がん細胞の表面にある。一部の態様では、がんは急性骨髄性白血病（AML）である。

【 0 0 3 0 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、抗体、またはその抗原結合断片は、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質と複合体を形成したNPMP1cネオエピトープを含む抗原に、100nMまたはそれ未満、50nMまたはそれ未満、20nMまたはそれ未満、10nMまたはそれ未満、0.5nMから100nMまで、または1nMから15nMまでの平衡解離定数（Kd）で結合する。

10

【 0 0 3 1 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、免疫エフェクター細胞上の第2の抗原にさらに特異的に結合する二重特異性抗体、またはその抗原結合断片である、抗体、またはその抗原結合断片を提供する。一部の態様では、エフェクター細胞は、T細胞、ナチュラルキラー細胞またはマクロファージである。一部の態様では、第2の抗原はCD3である。一部の態様では、CD3は、T細胞上に発現されるヒトCD3である。一部の態様では、第2の抗原はNKp46である。一部の態様では、NKp46は、NK細胞上に発現されるヒトNKp46である。一部の態様では、第2の抗原はCD16Aである。一部の態様では、CD16Aは、NK細胞上に発現されるヒトCD16Aである。一部の態様では、第2の抗原は、CD40、CD47、4-1BB、TGFB、LAG-3、PD-1、TIM-3、CTLA-4、OX40、NKp30、NKG2A、NKG2DまたはDNAM-1である。

20

【 0 0 3 2 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、精製された抗体、またはその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 3 3 】

一部の態様では、本開示は、単離された核酸であって、核酸が、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合断片をコードする核酸配列を含む核酸を提供する。

30

【 0 0 3 4 】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、単離された核酸は、配列番号12のヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、単離された核酸は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 3 5 】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸を含む発現ベクターを提供する。一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸を含む発現ベクターによって形質転換された細胞を提供する。

40

【 0 0 3 6 】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合断片を作製するための方法であって、本明細書に記載される核酸を含む発現ベクターによって形質転換された細胞を、抗体、またはその抗原結合断片の発現を可能にする条件下で維持するステップを含む方法を提供する。一部の態様では、本方法は、抗体、またはその抗原結合断片を精製するステップをさらに含む。

【 0 0 3 7 】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合断片の治療有効量と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 8 】

50

一部の態様では、本開示は、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドであって、細胞外結合ドメインが、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する、CARポリペプチドを提供する。

【0039】

一部の態様では、本開示は、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドであって、細胞外結合ドメインが、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合断片を含む、CARポリペプチドを提供する。

【0040】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、膜貫通ドメインは、CD3-ゼータ、CD8、CD28、NKG2D、CD16、NKp44またはNKp46の膜貫通ドメインを含む。一部の態様では、細胞内ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、2B4、DAP10、CD137およびDAP12からなる群から選択される1つまたは複数の共刺激分子の1つまたは複数の共刺激ドメインを含む。

【0041】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、細胞内ドメインがCD3-ゼータシグナル伝達ドメインおよび4-1BB共刺激ドメインを含み、膜貫通ドメインがCD8膜貫通ドメインを含み、CARポリペプチドがCD8ヒンジ領域をさらに含む、CARポリペプチドを提供する。

【0042】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示はCARポリペプチドであって、細胞内ドメインは、配列番号27に示されるアミノ酸配列を含むCD3-ゼータシグナル伝達ドメイン、および配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む4-1BB共刺激ドメインを含み、CARポリペプチドは、CD8膜貫通ドメインおよびCD8ヒンジ領域を含み、CD8膜貫通ドメインおよびCD8ヒンジ領域は、配列番号25に示されるアミノ酸配列を含み、細胞外結合ドメインは、抗体、またはその抗原結合断片、および配列番号23に示されるアミノ酸配列を含むリーディング配列を含む、CARポリペプチドを提供する。

【0043】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、細胞外結合ドメイン内の、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号24に示されるアミノ酸配列、または配列番号24のアミノ酸配列と少なくとも70%同一な、少なくとも75%同一な、少なくとも80%同一な、少なくとも85%同一な、少なくとも90%同一な、もしくは少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含むscFvである。

【0044】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、細胞内ドメインは、自己切断性ペプチド配列およびサイトカインをさらに含み、自己切断性ペプチドの切断によりサイトカインが放出される。一部の態様では、サイトカインは、IL-12、IL-7、IL-13、IL-15、TNF-、IFN-、またはCCL19である。

【0045】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、配列番号22に示されるアミノ酸配列、または配列番号22のアミノ酸配列と少なくとも70%同一な、少なくとも75%同一な、少なくとも80%同一な、少なくとも85%同一な、少なくとも90%同一な、もしくは少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含むCARポリペプチドを提供する。

【0046】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載されるCARポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。一部の態様では、単離された核酸は、配列番号30のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列、または配列番号 30 のヌクレオチド配列と少なくとも 70% 同一、少なくとも 75% 同一、少なくとも 80% 同一、少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、もしくは少なくとも 95% 同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターであって、発現ベクターがウイルス発現ベクターまたは非ウイルス発現ベクターである発現ベクターを提供する。一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターであって、発現ベクターがウイルス発現ベクターであり、ウイルス発現ベクターがレンチウイルス発現ベクターである発現ベクターを提供する。

【0047】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターによって形質転換された細胞を提供する。一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドを発現する細胞を提供する。一部の態様では、細胞は免疫エフェクター細胞であり、C A R ポリペプチドの発現は、免疫エフェクター細胞を、クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原を発現するがん細胞に標的化させる。一部の態様では、M H C クラス I タンパク質は、H L A - A * 2 タンパク質であるか、または H L A - A * 0 2 アレルグループによってコードされる。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、野生型 N P M 1 を発現するがん細胞を実質的に標的とせず、および/またはその殺滅を誘導しない。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、野生型 N P M 1 を発現するがん細胞を実質的に標的としない。一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、野生型 N P M 1 を発現するがん細胞の殺滅を実質的に誘導しない。一部の態様では、細胞は T 細胞である。一部の態様では、T 細胞はヒト C D 8 + T 細胞である。一部の態様では、細胞はナチュラルキラー (N K) 細胞である。一部の態様では、細胞はマクロファージである。一部の態様では、がん細胞は急性骨髄性白血病 (A M L) 細胞である。

【0048】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターによって形質転換された細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドを発現する細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0049】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドを発現する細胞を作製するための方法であって、(i) 対象の末梢血単核細胞 (P M B C) から細胞を精製するステップ、(i i) 任意選択で、抗 C D 3 抗体、またはその抗原結合断片および/または抗 C D 2 8 抗体、またはその抗原結合断片によって細胞を活性化するステップ、(i i i) 本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターによって細胞に形質導入するステップ、(i v) C A R ポリペプチドを発現する細胞を単離するステップ、ならびに (v) 任意選択で、単離された細胞を増大させるステップを含む方法を提供する。

【0050】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される C A R ポリペプチドを発現する細胞を作製するための方法であって、(i) 多能性幹細胞 (i P S C) を誘導して、免疫エフェクター細胞に分化させるステップ、(i i) 本明細書に記載される C A R ポリペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターにより、免疫エフェクター細胞に形質導入するステップ、(i i i) C A R ポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞を単離するステップ、および (i v) 任意選択で、単離された免疫エフェクター細胞を増大させるステップを含む方法を提供する。

【0051】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、免疫エフェクター細胞は N K 細胞

10

20

30

40

50

である。一部の態様では、免疫エフェクター細胞はマクロファージである。一部の態様では、免疫エフェクター細胞はT細胞である。

【0052】

一部の態様では、本開示は、がんの治療を必要とする対象においてがんを治療する方法であって、がんを含む細胞の細胞表面が、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示し、本明細書に記載される抗体、もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載される細胞、または本明細書に記載される医薬組成物を、がんを治療するのに十分な量で対象に投与するステップを含む方法を提供する。一部の態様では、がんは急性骨髄性白血病(AML)である。一部の態様では、がんを治療する方法は、がんの量を減少させる方法、または対象における生存期間を延長させる方法である。

10

【0053】

一部の態様では、本開示は、急性骨髄性白血病(AML)の治療を必要とする対象においてAMLを治療する方法であって、本明細書に記載される抗体、もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載される細胞、または本明細書に記載される医薬組成物を、AMLを治療するのに十分な量で対象に投与するステップを含む方法を提供する。一部の態様では、AMLは、再発性AMLまたは難治性AMLである。

【0054】

一部の態様では、本開示は、AMLから寛解している対象においてAMLの再発を予防する方法であって、本明細書に記載される抗体、もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載される細胞、または本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

20

【0055】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、投与のステップの前に、対象がNPM1cを発現するか否か、または対象がNPM1遺伝子におけるNPM1c変異を有するか否かを検出し、対象がNPM1cを発現するかまたはNPM1c変異を有する場合、投与のステップに進むステップを含む方法を提供する。

【0056】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本開示は、投与が静脈内、髄腔内、骨内、または脊髄内である方法を提供する。

30

【0057】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、本方法は、1つまたは複数の追加の治療薬または手順を投与するステップをさらに含む。一部の態様では、追加の治療薬は免疫チェックポイント分子の阻害剤であり、任意選択で、免疫チェックポイント分子はTIM-3、PD-1、PD-L1またはCTLA-4であり、任意選択で、阻害剤は抗体である。

【0058】

一部の態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための医薬の製造における、本明細書に記載される抗体、もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるCARポリペプチド、本明細書に記載される細胞、または本明細書に記載される医薬組成物の使用であって、がんを含む細胞の細胞表面が、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示し；任意選択で、使用が、1つまたは複数の追加の治療薬または手順と組み合わせられたものである、使用を提供する。

40

【0059】

前記の態様または関連する態様のいずれかにおいて、対象はヒトである。

【0060】

一部の態様では、本開示は、(i)本明細書に記載される抗体、もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるCARポリペプチド、本明細書に記載される細胞、または本明細書に記載される医薬組成物；(ii)任意選択で、1つまたは複数の追加の治療薬、

50

および (i i i) 対象におけるがんの治療に使用するための説明書を含む 1 つもしくは複数の容器を含むキットを提供する。

【 0 0 6 1 】

別の態様では、MHC (例えば、MHCクラスI) タンパク質 (例えば、HLA - A 2) と複合体を形成した (またはそれによって提示される) ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書に記載される。この態様のある特定の実施形態では、MHC (例えば、MHCクラスI) タンパク質 (例えば、HLA - A 2) と複合体を形成した (またはそれによって提示される) ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、例えば、(i) 抗原に結合する抗体クローンを、酵母表面ディスプレイ抗体 (例えば、scFv) ライブラリーまたはファージディスプレイ抗体 (例えば、scFv) ライブラリーを使用して単離するステップ、および (i i) 酵母表面ディスプレイ抗体 (例えば、scFv) ライブラリーまたはファージディスプレイ抗体 (例えば、scFv) ライブラリーを使用し、抗体クローンを、複数回 (2回、3回、4回またはより多くの回数) の陽性選択 (抗原に結合する酵母またはファージのクローンを選択する) および複数回 (2回、3回、4回またはより多くの回数) の陰性選択 (例えば、MHCタンパク質単独および/または対照ペプチド (すなわち、ネオエピトープとは異なるペプチド) 複合体を形成したMHCタンパク質に結合する酵母またはファージのクローンを選択して除去する) に供することによって、抗原に特異的に結合する抗体クローンを選択するステップ) によって生成され; 選択された抗体クローンは、抗原には結合し、MHCタンパク質単独および/または対照ペプチドと複合体を形成したMHCタンパク質には結合しないか、または実質的に結合しない。この態様のある特定の実施形態では、抗原は、二量体ネオエピトープ - MHC複合体である。この態様のある特定の実施形態では、ネオエピトープ - MHC複合体は、NPM1c : HLA - A 2である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 2 】

【 図 1 - 1 】 図 1 A ~ 1 D は、AIQ - HLA - A 2 複合体に特異的なヒト scFv の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 A は、エピトープペプチド - HLA - A 2 複合体、酵母表面上にディスプレイされた scFv、および酵母細胞表面上の scFv へのペプチド - HLA - A 2 複合体の結合の概略を示す。概略図は Chao et al., NAT PROTOC 1: 755 (2006) から改編した。

【 図 1 - 2 】 図 1 A ~ 1 D は、AIQ - HLA - A 2 複合体に特異的なヒト scFv の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 B - 1 および 1 B - 2 は、AIQ - HLA - A 2 複合体を特異的に認識する scFv をディスプレイする酵母細胞を単離するために使用した戦略およびステップを示す。選択のラウンドを左側に示す (図 1 B - 1 にラウンド 1 ~ 5 を、図 1 B - 2 にラウンド 6 ~ 9 を示す)。「抗原」は、陽性選択または陰性選択に使用したペプチド - HLA - A 2 複合体または HLA - A 2 単独を示す。選択の最初の 2 ラウンドでは、酵母細胞は磁気細胞選別 (MACS) によって選択した。残りの選択のラウンドでは、酵母細胞は FITC 標識抗 c - Myc 抗体および PE 標識抗マウス IgG または APC 標識ストレプトアビジンによる染色に基づくフローサイトメトリーによって選別した。選別した細胞についてのゲートを示す。FACS プロットは # 1 から # 7 まで標識した。

【 図 1 - 3 】 図 1 A ~ 1 D は、AIQ - HLA - A 2 複合体に特異的なヒト scFv の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 B - 1 および 1 B - 2 は、AIQ - HLA - A 2 複合体を特異的に認識する scFv をディスプレイする酵母細胞を単離するために使用した戦略およびステップを示す。選択のラウンドを左側に示す (図 1 B - 1 にラウンド 1 ~ 5 を、図 1 B - 2 にラウンド 6 ~ 9 を示す)。「抗原」は、陽性選択または陰性選択に使用したペプチド - HLA - A 2 複合体または HLA - A 2 単独を示す。選択の最初の 2 ラウンドでは、酵母細胞は磁気細胞選別 (MACS) によって選択した。残りの選択のラウンドでは、酵母細胞は FITC 標識抗 c - Myc 抗体および PE 標識抗マウ

ス Ig G または APC 標識 ストレプトアビジンによる染色に基づくフローサイトメトリーによって選別した。選別した細胞についてのゲートを示す。FACS プロットは # 1 から # 7 まで標識した。

【図 1 - 4】図 1 A ~ 1 D は、A I Q - H L A - A 2 複合体に特異的なヒト s c F v の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 C - 1 および 1 C - 2 は、生存細胞についてのフローサイトメトリーデータ (F A C S) を示す。ラウンド 4 から 9 までの選別した酵母細胞を増大させ、次いで F I T C 標識抗 c - M y c 抗体およびビオチン標識 H L A - A 2、G I L - H L A - A 2、S L L - H L A - A 2、または A I Q - H L A - A 2、次に APC 標識 ストレプトアビジンで染色し、生存細胞 (D A P I 陰性) についてフローサイトメトリーによってゲーティングした。ラウンド 4 および 5 についてのデータを 10
図 1 C - 1 に、ラウンド 6 ~ 9 についてのデータを 図 1 C - 2 に示す。FACS プロットは # 1 から # 2 9 まで標識した。

【図 1 - 5】図 1 A ~ 1 D は、A I Q - H L A - A 2 複合体に特異的なヒト s c F v の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 C - 1 および 1 C - 2 は、生存細胞についてのフローサイトメトリーデータ (F A C S) を示す。ラウンド 4 から 9 までの選別した酵母細胞を増大させ、次いで F I T C 標識抗 c - M y c 抗体およびビオチン標識 H L A - A 2、G I L - H L A - A 2、S L L - H L A - A 2、または A I Q - H L A - A 2、次に APC 標識 ストレプトアビジンで染色し、生存細胞 (D A P I 陰性) についてフローサイトメトリーによってゲーティングした。ラウンド 4 および 5 についてのデータを 20
図 1 C - 1 に、ラウンド 6 ~ 9 についてのデータを 図 1 C - 2 に示す。FACS プロットは # 1 から # 2 9 まで標識した。

【図 1 - 6】図 1 A ~ 1 D は、A I Q - H L A - A 2 複合体に特異的なヒト s c F v の酵母表面ディスプレイによる単離を示す図である。図 1 D は、フローサイトメトリーデータを示す。Y G 1 または Y G 2 クローンを発現する酵母細胞を染色し、図 1 C のように解析した。図 1 B、図 1 C、および 図 1 D におけるパーセンテージは、ゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

【図 2 - 1】図 2 A ~ 2 E は、A M L 細胞上の A I Q - H L A - A 2 複合体に対する Y G 1 s c F v の特異的かつ高親和性の結合を示す図である。図 2 A は、s c F v - F c 融合タンパク質を発現するための切り替え可能な酵母ディスプレイ / 分泌ベクターの概略を示す図である。この切り替え可能な系において、s c F v - F c は、O m e Y が培養に 30
添加されるか否かによって、酵母細胞上に分泌またはディスプレイされ得る (V a n D e v e n t e r e t a l . , P R O T E I N E N G D E S S E L 2 8 : 3 1 7 (2 0 1 5)) 。 図 2 B は、精製された Y G 1 s c F v - F c タンパク質の S D S - P A G E 解析を示す。レーン 1 : タンパク質ラダー、レーン 2 : 非還元 s c F v - F c タンパク質 (1 μ g)、レーン 3 : 還元 s c F v - F c タンパク質 (1 μ g)。ゲルはクーマシーブルーを使用して染色した。

【図 2 - 2】図 2 A ~ 2 E は、A M L 細胞上の A I Q - H L A - A 2 複合体に対する Y G 1 s c F v の特異的かつ高親和性の結合を示す図である。図 2 C は、O C I - A M L 3、T 2、G M B、P C - 3、および O C I - A M L 2 細胞による H L A - A 2 発現のフローサイトメトリーデータを示す。暗い陰影を付けたヒストグラム : 抗 H L A - A 2 で染色、および明るい陰影を付けたヒストグラム : アイソタイプ対照抗体で染色。図 2 D は、 40
O C I - A M L 3、T 2、G M B、および P C - 3 細胞による A I Q - H L A - A 2 発現のフローサイトメトリーデータを示す。暗い陰影を付けたヒストグラム : Y G 1 s c F v - F c および抗 H A で染色、明るい陰影を付けたヒストグラム : B S A およびそれに続いて抗 H A で染色。三連測定からの代表的なデータを示す。

【図 2 - 3】図 2 A ~ 2 E は、A M L 細胞上の A I Q - H L A - A 2 複合体に対する Y G 1 s c F v の特異的かつ高親和性の結合を示す図である。図 2 E は、バイオレイヤー干渉法による Y G 1 s c F v - F c と A I Q - H L A - A 2、S L L - H L A - A 2、または H L A - A 2 との間の相互作用の速度論的解析を示す。F o r t e B i o O c t e t R E D 9 6 の ストレプトアビジンバイオセンサーチップを、ビオチン化 Y G 1 s c F v - F c タンパク質でコートした。増加する濃度 (結合曲線の下に示す) の A I Q - 50

H L A - A 2、S L L - H L A - A 2、またはH L A - A 2にチップを浸漬してs c F v - F cへの結合(会合)を測定し、続いて緩衝液を含むウェルに移して解離速度(解離)を測定した。3回の個別の実験からの代表的なデータを示す。

【図3-1】図3A~3Dは、A I Q - H L A - A 2複合体に特異的なN P M 1 c - C A R - T細胞(Y G 1 s c F vを含む)の生成を示す図である。図3Aは、s c F v (Y G 1またはC D 1 9)、C D 8 細胞外ヒンジおよび膜貫通ドメイン、4 - 1 B B共刺激ドメイン、ならびにC D 3 活性化ドメイン、それに続く自己切断型P 2 AおよびE G F F PからなるC A Rベクターの概略を示す。図3Bは、A M L細胞上のA I Q - H L A - A 2複合体のN P M 1 c C A R - T細胞による認識の概略を示す。

【図3-2】図3A~3Dは、A I Q - H L A - A 2複合体に特異的なN P M 1 c - C A R - T細胞(Y G 1 s c F vを含む)の生成を示す図である。図3Cは、非形質導入T細胞および形質導入したT細胞によるC A R発現のフローサイトメトリーデータを示す。形質導入したT細胞はG F P +細胞の選別によって富化し増大させて、s c F vを認識するA F 6 4 7標識抗ヒトI g G重鎖および軽鎖抗体で染色した。非形質導入T細胞は選別せずに活性化し増大させた。生存細胞(D A P I⁻)のG F Pと抗ヒトI g Gによる染色のプロファイルを示す。図3Dは、N P M 1 c C A R - T細胞がA I Q - H L A - A 2複合体を認識することを示すフローサイトメトリーデータを示す。非形質導入T細胞および形質導入したT細胞をビオチン化したA I Q - H L A - A 2またはS L L - H L A - A 2またはH L A - A 2複合体とインキュベートし、続いてストレプトアビジン - A P Cで染色した。生存している(D A P I⁻)非形質導入T細胞、N P M 1 c C A R - T細胞、およびC D 1 9 C A R - T細胞のG F Pとストレプトアビジン - A P Cによる染色プロファイルを示す。図3Cおよび3Dのデータは、少なくとも3回の独立した実験の代表である。パーセンテージは、ゲーティングした領域中の細胞のパーセンテージを示す。

【図4-1】図4A~4Jは、N P M 1 c C A R - T細胞(Y G 1 s c F vを含む)が、H L A - A 2 + N P M 1 c + ヒトA M L細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4A~4Bは、N P M 1 c C A R - T細胞が標的細胞を*in vitro*で殺滅することを示す。N P M 1 c C A R - T細胞を、表示したエフェクター:標的(E:T)比でO C I - A M L 3、G M B、およびP C - 3腫瘍細胞とともに24時間、共培養した。細胞混合物をC D 8およびC D 3 3、C D 1 9、またはm C h e r r yについて染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。C A R - T細胞のパーセンテージをC D 8染色によって、O C I - A M L 3細胞のパーセンテージをC D 3 3によって、G M B細胞のパーセンテージをC D 1 9によって、P C - 3のパーセンテージをm C h e r r yによって定量化した。腫瘍細胞の特異的溶解のパーセンテージを計算した(計算式については実施例の材料および方法の部を参照)。異なるE:TにおけるC D 8に対するC D 3 3、C D 1 9、またはm C h e r r yの染色プロファイル(図4A)および特異的溶解のパーセンテージ(図4B)を示す。ゲーティングした領域の細胞のパーセンテージを示している。p値は、同じE:T比におけるN P M 1 c C A R - T細胞と非形質導入T細胞との比較を示している。

【図4-2】図4A(続き)である。

【図4-3】図4A(続き)である。

【図4-4】図4A(続き)である。

【図4-5】図4A~4Jは、N P M 1 c C A R - T細胞(Y G 1 s c F vを含む)が、H L A - A 2 + N P M 1 c + ヒトA M L細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4A~4Bは、N P M 1 c C A R - T細胞が標的細胞を*in vitro*で殺滅することを示す。N P M 1 c C A R - T細胞を、表示したエフェクター:標的(E:T)比でO C I - A M L 3、G M B、およびP C - 3腫瘍細胞とともに24時間、共培養した。細胞混合物をC D 8およびC D 3 3、C D 1 9、またはm C h e r r yについて染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。C A R - T細胞のパーセンテージをC D 8染色によって、O C I - A M L 3細胞のパーセンテージをC D 3 3によって、G M B細胞のパーセンテージをC D 1 9によって、P C - 3のパーセンテージをm C

10

20

30

40

50

herryによって定量化した。腫瘍細胞の特異的溶解のパーセンテージを計算した（計算式については実施例の材料および方法の部を参照）。異なるE:TにおけるCD8に対するCD33、CD19、またはmCherryの染色プロファイル（図4A）および特異的溶解のパーセンテージ（図4B）を示す。ゲーティングした領域の細胞のパーセンテージを示している。p値は、同じE:T比におけるNPM1c CAR-T細胞と非形質導入T細胞との比較を示している。

【図4-6】図4A~4Jは、NPM1c CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）が、HLA-A2+NPM1c+ヒトAML細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4Cは、CAR-T細胞と非形質導入T細胞との間のIFN-およびIL-2の発現の比較を示す。NPM1c CAR-T細胞および非形質導入T細胞を、モネンシンおよびプレフェルジンAの存在下で、OCI-AML3、GMB、またはPC-3と12時間、共培養した。細胞をCD3について染色し、次いで透過処理して、細胞内IFN- またはIL-2について染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。IFN- +またはIL-2+のNPM1c CAR-T細胞および非形質導入T細胞のパーセンテージを示す。P値を示している。

10

【図4-7】図4A~4Jは、NPM1c CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）が、HLA-A2+NPM1c+ヒトAML細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4Dは、NPM1c CAR-T細胞がNPM1c+HLA-A2+標的細胞によって刺激されて多種のサイトカインを分泌することを示す。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞をNPM1c+HLA-A2+OCI-AML3細胞とともに16時間、共培養した。培養上清を採取し、Quantibody Human Cytokine Arrayを使用して20種の異なるサイトカインについて同時にアッセイした。それぞれのサイトカインは、四連測定抗体スポットを含んでいた。異なる4名の健康なドナー由来のT細胞を個別に分析した。n=4の反復抗体スポット。グラフのバーおよびエラーバーは平均±s.e.を表す。p値を示している。

20

【図4-8】図4D（続き）である。

【図4-9】図4A~4Jは、NPM1c CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）が、HLA-A2+NPM1c+ヒトAML細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4E~4Fは、NPM1c CAR-T細胞がNPM1c+HLA-A2+標的細胞に应答して増殖することを示す。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞をOCI-AML3細胞とともに5日間、共培養した。CAR-T細胞または非形質導入T細胞の絶対細胞数を、プレシジョンカウントビーズを使用するフローサイトメトリーによって決定した。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞によるKi-67の発現を、細胞内染色、それに続くフローサイトメトリーによってアッセイした。図4Eは、5日目におけるNPM1c CAR-T細胞および非形質導入T細胞の数の比較を提供する。図4Fは、非形質導入T細胞とNPM1c CAR-T細胞との間の細胞内Ki-67染色の平均蛍光強度(MFI)の比較を提供する。p値はNPM1c CAR-T細胞と非形質導入T細胞との間の比較を示す。n=5の生物学的に独立した試料。グラフのバーおよびエラーバーは平均±s.e.を表す。

30

【図4-10】図4A~4Jは、NPM1c CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）が、HLA-A2+NPM1c+ヒトAML細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す図である。図4G~4Hは、NPM1c CAR-T細胞がHLA-A2+NPM1c+ヒト腫瘍細胞を*in vitro*で特異的に殺滅することを示す。OCI-AML2（HLA-A2陽性）およびPC-3（HLA-A2陰性）細胞に、NPM1cを発現するレンチウイルス（レンチ-NPM1c）または空の陰性対照（レンチ-NC）を形質導入した。形質導入した細胞を選別し、増大させた。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞による形質導入した、または対照のOCI-AML2細胞（図4G）およびPC-3細胞（図4H）の特異的殺滅の比較を示す。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞を、形質導入したまたは対照のOCI-AML2またはPC-3標的細胞とともに表示したE:T比で24時間、共培養した。標的細胞の殺滅は、生

40

50

存している標的細胞のルシフェラーゼ活性をアッセイすることによって測定した。異なる E : T 比における腫瘍細胞の特異的溶解のパーセンテージを計算した。それぞれの反応における標的細胞および T 細胞を示す。

【図 4 - 1 1】図 4 A ~ 4 J は、NPM1c CAR-T 細胞 (YG1 scFv を含む) が、HLA-A2 + NPM1c + ヒト AML 細胞を *in vitro* で特異的に殺滅することを示す図である。図 4 I は、異なる濃度の AIQ ペプチド (左のパネル) または SLL ペプチド (右のパネル) でパルス処理した T2 細胞に結合する YG1 scFv - FC のフローサイトメトリー解析を示す。

【図 4 - 1 2】図 4 A ~ 4 J は、NPM1c CAR-T 細胞 (YG1 scFv を含む) が、HLA-A2 + NPM1c + ヒト AML 細胞を *in vitro* で特異的に殺滅することを示す図である。図 4 J は、異なる濃度の AIQ ペプチド (左のパネル) または SLL ペプチド (右のパネル) でパルス処理した T2 細胞の、NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞による特異的殺滅の比較を示す。NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞を、ペプチドでパルス処理した T2 標的細胞とともに表示した E : T 比で 24 時間、共培養した。標的細胞の殺滅は、生存している標的細胞のルシフェラーゼ活性をアッセイすることによって測定した。p 値は、NPM1c CAR-T 細胞と非形質導入 T 細胞との間の同じ E : T 比における比較を示す。n = 3 の生物学的に独立した試料。データ点およびエラーバーは平均 \pm s.e. を表す。

【図 5 - 1】図 5 A ~ 5 H は、NPM1c CAR-T (YG1 scFv を含む) 療法が NPM1c 陽性 AML 細胞を有するマウスにおいて白血病負荷を低減し生存期間を延長するが、NPM1c 陰性 AML 細胞を有するマウスではそうでないことを示す図である。図 5 A は、実験デザインを示す。NSG マウスに OCI-AML3 細胞 (1×10^6) または GMB 細胞 (2×10^6) を静脈内注射し (D - 4)、4 日後 (D 0) に生着についてイメージングした。次いでマウスに 1×10^7 個の NPM1c CAR-T 細胞、非形質導入 T 細胞、または CD19 CAR-T 細胞を静脈内注射した。マウスを生物発光イメージングによって 3 日ごとにモニタリングして、腫瘍負荷および生存を評価した。

【図 5 - 2】図 5 A ~ 5 H は、NPM1c CAR-T (YG1 scFv を含む) 療法が NPM1c 陽性 AML 細胞を有するマウスにおいて白血病負荷を低減し生存期間を延長するが、NPM1c 陰性 AML 細胞を有するマウスではそうでないことを示す図である。図 5 B は、NPM1c CAR-T 細胞で処置したマウスと非形質導入 T 細胞で処置したマウスとの間の、T 細胞注射後の表示した日 (D 0 ~ D 18) における生物発光イメージングによって測定した OCI-AML3 白血病負荷の比較を示す (n = 5)。各実験群についての全フラックス (全身 OCI-AML3 白血病細胞からのルシフェラーゼシグナル) の比較を示す。実験は、1 群あたり 4 または 5 匹のマウスで 2 回繰り返した。図 5 C は、図 5 B のように NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞で処置したマウスの Kaplan-Meier 生存曲線 (n = 9) を示す。P 値を示している。

【図 5 - 3】図 5 A ~ 5 H は、NPM1c CAR-T (YG1 scFv を含む) 療法が NPM1c 陽性 AML 細胞を有するマウスにおいて白血病負荷を低減し生存期間を延長するが、NPM1c 陰性 AML 細胞を有するマウスではそうでないことを示す図である。図 5 D は、NPM1c CAR-T 細胞、非形質導入 T 細胞で処置したマウスと CD19 CAR-T 細胞で処置したマウスとの間の、T 細胞注射後の表示した日 (D 0 ~ D 21) における生物発光イメージングによって測定した GMB リンパ腫負荷の比較を示す (n = 3 ~ 5)。各実験群についての全フラックス (全身 GMB 細胞からのルシフェラーゼシグナル) の比較を示す。実験は、1 群あたり 3 ~ 5 匹のマウスで 2 回繰り返した。全フラックスについての P 値は、非形質導入 T 細胞と NPM1c CAR-T について p = 0.992、CD19 CAR-T と非形質導入 T 細胞について p = 0.003、CD19 CAR-T と NPM1c CAR-T について p = 0.047。図 5 E は、図 5 D のように NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞または CD19 CAR-T 細胞で処置したマウスの Kaplan-Meier 生存曲線 (n = 3 ~ 5) を示す。P 値：非形質導入 T と NPM1c CAR-T について p = 0.124、CD19 CAR-T と非形質

10

20

30

40

50

導入Tについて $p = 0.012$ 、および $CD19$ CAR-Tと $NPM1c$ CAR-Tについて $p = 0.015$ 。

【図5-4】図5A~5Hは、 $NPM1c$ CAR-T (YG1 scFvを含む)療法が $NPM1c$ 陽性AML細胞を有するマウスにおいて白血病負荷を低減し生存期間を延長するが、 $NPM1c$ 陰性AML細胞を有するマウスではそうでないことを示す図である。図5Fは、 $NPM1c$ CAR-T細胞、非形質導入T細胞、またはPBSを投与したマウスにおいてT細胞/PBSの注射後の表示した日(D0~D21)に生体発光イメージングによって測定したOCI-AML3白血病負荷の比較を提供する($n = 3 \sim 4$)。全フラックス(全身のOCI-AML3細胞からのルシフェラーゼシグナル)の比較を示す。P値は、PBSと非形質導入T $p = 0.395$ 、PBSと $NPM1c$ CAR-T $p = 0.018$ 、および非形質導入Tと $NPM1c$ CAR-T $p = 0.011$ である。図5Gは、 $NPM1c$ CAR-T細胞($n = 5$)で処置したマウスと非形質導入T細胞($n = 5$)で処置したマウスとの間においてT細胞の注射後の表示した日(D0~D21)に生体発光イメージングによって測定したOCI-AML2白血病負荷の比較を提供する。全フラックス(全身のOCI-AML2細胞からのルシフェラーゼシグナル)の比較を示す。図5Hは、 $NPM1c$ CAR-T細胞($n = 5$)または非形質導入T細胞($n = 5$)で処置した図5Gに示すマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を提供する。データ点およびエラーバーは平均 \pm s.e.を表す。p値を示す。

10

【図6-1】図6A~6Iは、 $NPM1c$ CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6Aは、OCI-AML3 AML細胞、および次に非形質導入T細胞を注射したNSGマウス、またはOCI-AML3 AML細胞、および次に $NPM1c$ CAR-T細胞を注射したNSGマウスの間で生物発光イメージングによって測定したOCI-AML3白血病負荷の比較を示す。全フラックス(全身のOCI-AML3細胞からのルシフェラーゼシグナル)の比較を示す。マウス($n = 5$)は、T細胞の注射の日(0日目)および18日後にイメージングした。

20

【図6-2】図6A~6Iは、 $NPM1c$ CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6B~6Cは、図6Aで表されるマウスから得た細胞集団についてのゲーティング戦略および発現プロファイルを示す代表的なフローサイトメトリープロットを示す。血液、脾、骨髄、および肝を18日目に収集して単一細胞懸濁液を調製し、マウスCD45ならびにヒトCD45、CD8、CD33、PD-1、およびTim-3について染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。血液および脾(図6B)ならびに骨髄および肝(図6C)についての代表的な染色プロファイルおよびゲーティング戦略を示す。ゲーティング戦略には、生細胞(DAPI⁻)におけるmCD45対hCD45のゲーティング、hCD45⁺細胞におけるhCD33対hCD8のゲーティング、hCD8⁺細胞におけるhPD-1対hCD8のゲーティング、およびhCD8⁺細胞におけるhTim-3対hCD8のゲーティングが含まれる。数字は、ゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

30

【図6-3】図6A~6Iは、 $NPM1c$ CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6B~6Cは、図6Aで表されるマウスから得た細胞集団についてのゲーティング戦略および発現プロファイルを示す代表的なフローサイトメトリープロットを示す。血液、脾、骨髄、および肝を18日目に収集して単一細胞懸濁液を調製し、マウスCD45ならびにヒトCD45、CD8、CD33、PD-1、およびTim-3について染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。血液および脾(図6B)ならびに骨髄および肝(図6C)についての代表的な染色プロファイルおよびゲーティング戦略を示す。ゲーティング戦略には、生細胞(DAPI⁻)におけるmCD45対hCD45のゲーティング、hCD45⁺細胞におけるhCD33対hCD8のゲーティング、hCD8⁺細胞におけるhPD-1対hCD8のゲーティング、およびhCD8⁺細胞におけるhTim-3対hCD8

40

50

のゲーティングが含まれる。数字は、ゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

【図6-4】図6A~6Iは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6Dは、NPM1c CAR-T細胞および非形質導入T細胞を投与したマウス間の異なる組織におけるhCD33⁺白血病細胞およびhCD8⁺T細胞の全数の比較を示す(左のバーは非形質導入T細胞による処置を表し、右のバーはNPM1c CAR-T細胞による処置を表す)。

【図6-5】図6A~6Iは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6Eは、NPM1c CAR-T細胞を投与したマウスと非形質導入T細胞を投与したマウスとの間の異なる組織におけるhCD45⁺細胞の中のhCD33⁺白血病細胞およびhCD8⁺T細胞のパーセンテージの比較を示す(左のバーは非形質導入T細胞による処置を表し、右のバーはNPM1c CAR-T細胞による処置を表す)。

【図6-6】図6A~6Iは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6Fは、NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞を投与したマウスの異なる組織におけるhCD33⁺白血病細胞に対するhCD8⁺T細胞のパーセンテージの比を示す(左のバーは非形質導入T細胞による処置を表し、右のバーはNPM1c CAR-T細胞による処置を表す)。図6G~6Hは、異なる組織におけるヒトCD8⁺T細胞の中のPD1⁺T細胞(図6G)またはTim-3⁺T細胞(図6H)のパーセンテージを示す(左のバーは非形質導入T細胞による処置を表し、右のバーはNPM1c CAR-T細胞による処置を表す)。P値は図6A、6D、6E、6F、6G、および6Hにおいて示す(n=5)。

【図6-7】図6A~6Iは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、血液、脾、骨髄、および肝において白血病負荷を低減することを示す図である。図6Iは、NPM1c CAR-T細胞がCAR-T細胞の注射後30日で骨髄中の白血病細胞を効果的に排除することを示す。NSGマウスにOCI-AML3を移植し、4日後にNPM1c CAR-T細胞、非形質導入T細胞、またはPBSを注射した(マウスは図5Fに示す)。T細胞の注射の30日後に生存しているマウスの骨髄から細胞を収集した。細胞をマウスCD45ならびにヒトCD45、CD8、およびCD33について染色し、続いてフローサイトメトリーを行った。全細胞のFSCとDAPIによる染色プロファイル(左)、生(DAPI⁻)細胞についてゲーティングしたhCD45とmCD45による染色プロファイル(中)、およびhCD45⁺細胞のhCD33とhCD8による染色プロファイル(右)を示す。数字は、ゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

【図6-8】図6I(続き)である。

【図6-9】図6I(続き)である。

【図6-10】図6I(続き)である。

【図7-1】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Aは、NPM1c CAR-T細胞が*in vitro*において3名のドナーからのNPM1c⁺HLA-A2⁺初代AML芽細胞を殺滅することを示す。NPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞をAML芽細胞とともに表示した比で24時間、インキュベートした。AML芽細胞の絶対数は、CD8およびCD33について染色し、続いてプレシジョンカウントビーズを用いるフローサイトメトリーによって定量化した。異なるE:T比における腫瘍細胞の特異的溶解のパーセンテージを計算した。n=3の生物学的反復。グラフのバーおよびエラーバーは平均±s.e.を表す。p値を示す。

10

20

30

40

50

【図7-2】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Bは、HSPCによるHLA-A2発現のフローサイトメトリー解析を示す。EasySep Human CD34 Positive Selection Kitを使用して、2名のドナー胎児肝からヒトCD34⁺HSPCを精製した。濃いヒストグラム:抗HLA-A2で染色、および薄いヒストグラム:アイソタイプ対照抗体で染色。技術的三連測定からの代表的なデータを示す。図7Cは、YG1 scFv-Fc結合についてのHSPCのフローサイトメトリー解析を示す。濃い陰影のヒストグラム:YG1 scFv-Fcおよび抗HAで染色、薄い陰影のヒストグラム:BSAおよび続いて抗HAで染色。技術的三連測定による3回の個別の実験の代表的なデータを示す。

10

【図7-3】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Dは、NPM1c CAR-T細胞がHLA-A2⁺CD34⁺HSPCを殺滅しないことを示す。NPM1c CAR-T細胞および非形質導入T細胞をHSPCと表示したE:T比で24時間、インキュベートした。細胞混合物をCD8およびCD34について染色し、プレジジョンカウントビーズを用いるフローサイトメトリーによって定量化した。異なるE:T比におけるCD8(T細胞)とCD34(HSPC)の染色プロファイルの例を示す。ゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

20

【図7-4】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Eは、NPM1c CAR-T細胞と非形質導入T細胞との間の異なるE:T比における特異的細胞溶解の比較を示す。p値は、同じE:T比におけるNPM1c CAR-T細胞と非形質導入T細胞との間の比較を示す。n=3の生物学的反復。データ点およびエラーバーは平均±s.e.を表す。

【図7-5】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Fは、NPM1c CAR-T細胞による処置が初代HLA-A2⁺NPM1c⁺AML異種移植における白血病負荷を低減することを示す。NSGSマウスにヒトAML芽細胞を移植した。2週後にAML芽細胞が血液中に検出可能になったとき、マウスにNPM1c CAR-T細胞または非形質導入T細胞を投与した。T細胞の移入後の表示した日にマウスから採血し、単核細胞をmCD45、hCD45、およびhCD8について染色した。hCD8⁻の生細胞についてゲーティングしたhCD45とmCD45の代表的な染色プロファイルを示す。AML芽細胞はhCD45⁺hCD8⁻であった。数字はゲーティングした領域内の細胞のパーセンテージを示す。

30

40

【図7-6】図7A~7Gは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)が、*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅するが、正常なヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)に対して細胞傷害性を呈さないことを示す。図7Gは、NPM1c CAR-T細胞を投与したマウスと非形質導入T細胞を投与したマウスとの間の末梢血中のhCD45⁺CD8⁻AML芽細胞のパーセンテージの比較を示し、AML芽細胞のレベルは、T細胞の注射の前(0日目)、ならびにT細胞注射後9日目および18日目に測定した。左のバーは非形質導入T細胞による処置を表し、右のバーはNPM1c CAR-T細胞による処置を表す。グラフのバーおよびエラーバーは平均±s.e.を表す。p値(両側独立試料t検定)を

50

示す (n = 5) 。

【発明を実施するための形態】

【0063】

本開示は、少なくとも一部には、HLA-A2と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに、特異的に、かつ高い親和性で結合する単鎖可変抗体断片(scfv)の同定に基づく。本開示は、HLA-A2と複合体を形成したそのようなNPM1cネオエピトープに結合する新規scfv、抗体およびその抗原結合断片を提供する。加えて、本開示は、HLA-A2と複合体を形成したそのようなNPM1cネオエピトープに特異的に結合し、別の標的にもさらに結合する、本開示のscfvに基づく二重特異性結合分子を提供する。

10

【0064】

さらに、本開示は、HLA-A2と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドを提供する。

【0065】

さらに、本開示は、HLA-A2と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する細胞外結合ドメインを含むCARポリペプチドを発現するT細胞を提供する。本明細書に記載され、本明細書に提示される実施例に示されているように、HLA-A2と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する細胞外結合ドメインを含むCARポリペプチドを発現するT細胞は、*in vitro*でAML細胞を特異的に殺滅し、AMLマウスモデルにおいて*in vivo*で白血病の量を減少させ、生存期間を延長させる。

20

【0066】

したがって、抗体およびその抗原結合断片、二重特異性分子、CARポリペプチド、ならびに本明細書に記載されるCARポリペプチドを発現するT細胞は、NPM1c変異を保有するがんを治療するための標的化免疫療法のために有用である。例えば、本明細書に開示される、抗体およびその抗原結合断片、CARポリペプチド、CARポリペプチドを発現するT細胞は、急性骨髄性白血病(AML)を治療するための標的化免疫療法のために有用である。一態様では、NPM1cネオエピトープを含む抗原に、そのようなエピトープがクラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質(例えば、HLA-A2)と複合体を形成した(またはそれによって提示される)場合に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、以下のアミノ酸配列: AIQDLCLAV(配列番号1)、AIQDLCVAV(配列番号71)、CLAVEEVSL(配列番号72)、VEEVSLRK(配列番号73)、AVEEVSLR(配列番号74)、AVEEVSLRK(配列番号75)、CLAVEEVSLRK(配列番号76)を有するネオエピトープのうちの一つまたは複数に、そのようなエピトープがクラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質(例えば、HLA-A2)と複合体を形成した場合に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、MHCクラスIタンパク質単独には結合しないか、または実質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、MHCクラスIタンパク質と複合体を形成した対照ペプチド(例えば、対照ペプチドは、NY-ESO-1エピトープ(例えば、配列番号62を含むペプチド)またはインフルエンザウイルスM1エピトープ(例えば、配列番号63を含むペプチド)である)には結合しないか、または実質的に結合しない抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、NPM1cネオエピトープ単独(MHCクラスIタンパク質を伴わない)には結合しないか、または実質的に結合しない抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列AIQDLCLAV(配列番号1)を含み、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A2タンパク質(例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質)である。一部の態様では、抗原はがん細胞の表面にある(例えば、

30

40

50

がんが N P M 1 c + である場合、例えば、がんが A M L である場合)。一態様では、H L A - A 2 タンパク質 (例えば、H L A - A * 0 2 : 0 1 アレルによってコードされるタンパク質) と複合体を形成した A I Q D L C L A V (配列番号 1) を含むアミノ酸配列に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。本明細書に提供される抗体およびその抗原結合断片について、以下に記載する。

【 0 0 6 7 】

一態様では、(i) クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質 (例えば、H L A - A 2) と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する第 1 の結合ドメイン、および (i i) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含む二重特異性分子が、本明細書において提供される。一部の態様では、第 2 の抗原は、T 細胞またはナチュラルキラー細胞上に発現される抗原である。一部の態様では、第 2 の抗原は、C D 3 (例えば、ヒト C D 3)、N K p 4 6 (例えば、ヒト N K p 4 6)、または C D 1 6 A (例えば、ヒト C D 1 6 A) である。一態様では、(i) H L A - A 2 タンパク質 (例えば、H L A - A * 0 2 : 0 1 アレルによってコードされるタンパク質) と複合体を形成した、A I Q D L C L A V (配列番号 1) を含むアミノ酸配列に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン、および (i i) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含む二重特異性分子が、本明細書において提供される。本明細書に提供される二重特異性分子について、以下に記載する。

10

【 0 0 6 8 】

一態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片 (および任意選択で、薬学的に許容される担体) を含む医薬組成物が、本明細書において提供される。一態様では、本明細書に記載される二重特異性分子 (および任意選択で、薬学的に許容される担体) を含む医薬組成物が、本明細書において提供される。本明細書に提供される医薬組成物については、以下に記載する。

20

【 0 0 6 9 】

一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) ポリペプチドであって、細胞外ドメインが、クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質 (例えば、H L A - A 2) と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する、C A R ポリペプチドが本明細書において提供される。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む C A R ポリペプチドであって、細胞外ドメインが、H L A - A 2 タンパク質 (例えば、H L A - A * 0 2 : 0 1 アレルによってコードされるタンパク質) と複合体を形成した、A I Q D L C L A V (配列番号 1) を含むアミノ酸配列に特異的に結合する、C A R ポリペプチドが本明細書において提供される。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む C A R ポリペプチドであって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片を含む、C A R ポリペプチドが本明細書において提供される。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む C A R ポリペプチドであって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子を含む、C A R ポリペプチドが本明細書において提供される。本明細書に提供される C A R ポリペプチドについては、以下に記載する。

30

40

【 0 0 7 0 】

一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む C A R ポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞であって、細胞外ドメインが、クラス I 主要組織適合複合体 (M H C クラス I) タンパク質 (例えば、H L A - A 2) と複合体を形成した N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する、免疫エフェクター細胞が本明細書において提供される。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む C A R ポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞であって、細胞外ドメインが、H L A - A 2 タンパク質 (例えば、H L A - A * 0 2 : 0 1 アレルによってコードされるタンパク質) と複合体を形成した、A I Q D L C L A V (配列番号 1) を含むアミノ酸配列に特異的に結合する、免疫エフェクター細胞が本明細書において提供される

50

。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含むCARポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞であって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片を含む、免疫エフェクター細胞が本明細書において提供される。一態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含むCARポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞であって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子を含む、免疫エフェクター細胞が本明細書において提供される。一態様では、本明細書に記載されるCARポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞が、本明細書において提供される。一態様では、免疫エフェクター細胞は、T細胞（例えば、CD8⁺T細胞）、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージである。一態様では、CARポリペプチドの発現は、免疫エフェクター細胞を、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質と複合体を形成したNPM1cネオエピトープ（例えば、HLA-A2）を表面に提示しているがん細胞（例えば、がんはAMLである）に標的化させる。一態様では、CARポリペプチドの発現は、免疫エフェクター細胞を、HLA-A2タンパク質（例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）と複合体を形成したアミノ酸配列AIQDLCLAV（配列番号1）を表面に提示しているがん細胞（例えば、がんはAMLである）に標的化させる。本明細書に提供される免疫エフェクター細胞については、以下に記載する。

10

【0071】

一態様では、本明細書に記載されるいずれかの免疫エフェクター細胞（および任意選択で、薬学的に許容される担体）を含む医薬組成物が、本明細書において提供される。

20

【0072】

一態様では、対象（例えば、ヒト）においてがんを治療する方法であって、がんを含む細胞の細胞表面が、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示し、本明細書に記載されるいずれかの抗体または抗原結合断片を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。一態様では、対象（例えば、ヒト）においてがんを治療する方法であって、がんを含む細胞の細胞表面が、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示し、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。一態様では、対象（例えば、ヒト）においてがんを治療する方法であって、がんを含む細胞の細胞表面が、HLA-A2タンパク質（例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）と複合体を形成した、AIQDLCLAV（配列番号1）を含むアミノ酸配列を提示し、本明細書に記載されるいずれかの抗体または抗原結合断片を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。一態様では、対象（例えば、ヒト）においてがんを治療する方法であって、がんを含む細胞の細胞表面が、HLA-A2タンパク質（例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）と複合体を形成した、AIQDLCLAV（配列番号1）を含むアミノ酸配列を提示し、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。

30

40

【0073】

一部の態様では、対象（例えば、ヒト）においてNPM1c陽性がんを治療する方法であって、本明細書に記載されるいずれかの抗体または抗原結合断片を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。一部の態様では、対象（例えば、ヒト）においてNPM1c陽性がんを治療する方法であって、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。

【0074】

一態様では、対象（例えば、ヒト）においてAMLを治療する方法であって、本明細書に記載されるいずれかの抗体または抗原結合断片を対象に投与するステップを含む方法が

50

、本明細書において提供される。一態様では、対象（例えば、ヒト）においてA M Lを治療する方法であって、本明細書に記載されるC A Rポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書において提供される。

【0075】

本明細書に提供される抗体またはその抗原結合断片、本明細書に提供されるC A Rポリペプチド、本明細書に提供されるC A Rポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞、および本明細書に提供されるそれを含む医薬組成物を使用する治療の方法、それらの使用、ならびにそれらを含むキットについては、以下に記載する。

【0076】

本開示はまた、少なくとも一部には、M H Cタンパク質（特に、M H CクラスIタンパク質、例えば、H L A - A 2）と複合体を形成したネオエピトープ（特に、がんネオエピトープ）に特異的に結合するs c F vの同定に基づく。そのような特異的で親和性の高い抗体が単離されたことは、ネオエピトープ - M H C複合体に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片の開発には多くの課題が伴うことから驚くべきことであった。特に、ネオエピトープペプチドはM H Cタンパク質から容易に解離し、そのことがこの複合体に対して特異的な抗体を産生させることを困難にする。いかなる理論にも拘束されないが、酵母表面ディスプレイ法を使用した、M H Cタンパク質単独または対照ペプチドと複合体を形成したM H Cタンパク質に結合することなくネオエピトープ - M H C複合体には特異的に結合する酵母集団の複数回の陽性選択および陰性選択の使用により、ネオエピトープ - M H C複合体に特異的に結合するs c F vの同定がもたらされることが発見された。選択のステップは、実施例1および付属書類1に記載されている。いかなる理論にも拘束されないが、二量体ネオエピトープ - M H C複合体を抗原として使用したことも、高親和性の特異的s c F vの単離の成功に寄与した可能性がある。

【0077】

したがって、一態様では、M H C（例えば、M H CクラスI）タンパク質（例えば、H L A - A 2）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）ネオエピトープ（例えば、がんネオエピトープ）を含む抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。この態様のある特定の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、酵母表面ディスプレイ抗体（例えば、s c F v）ライブラリーまたはファージディスプレイ抗体（例えば、s c F v）ライブラリーを使用して生成され、任意選択で、複数回（2回、3回、4回またはより多くの回数）の陽性選択（抗原に結合する酵母またはファージの集団を選択する）および複数回（2回、3回、4回またはより多くの回数）の陰性選択（例えば、M H Cタンパク質単独および/または対照ペプチド（すなわち、ネオエピトープとは異なるペプチド）と複合体を形成したM H Cタンパク質に結合する酵母またはファージの集団を選択して除去する）を使用して、ネオエピトープ - M H C複合体に対する特異的結合剤について濃縮される。この態様の特定の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、酵母表面ディスプレイ抗体（例えば、s c F v）ライブラリーまたはファージディスプレイ抗体（例えば、s c F v）ライブラリーを使用して生成され、任意選択で、複数回（少なくとも3回、少なくとも4回または少なくとも5回）の陽性選択（抗原に結合する酵母またはファージの集団を選択する）および複数回（少なくとも2回、少なくとも3回、または少なくとも4回）の陰性選択（例えば、M H Cタンパク質単独および/または対照ペプチドと複合体を形成したM H Cタンパク質に結合する酵母またはファージの集団を選択して除去する）を使用して、ネオエピトープ - M H C複合体に対する特異的結合剤について濃縮される。ある特定の実施形態では、細胞集団は、選択ステップの後に（例えば、1回または複数回の陽性選択ステップの後に、1回または複数回の陰性選択ステップの後に、または各選択ステップの後に）増大される。この態様のある特定の実施形態では、抗原は、二量体ネオエピトープ - M H C複合体（特に、例えば、I g G F c、例えば、マウ

10

20

30

40

50

スまたはヒト I g G 1 を介して連結された 2 つのネオエピトープ：M H C 分子を有する)
 である。ある特定の実施形態では、酵母ディスプレイ法およびライブラリーが使用される
 。ある特定の実施形態では、陽性選択は、両方の抗原 (ネオエピトープ - M H C 複合体)
 および抗体 (例えば、s c F v) について染色される酵母またはファージの集団の選択 (10
 例えば、少なくとも 1 回または少なくとも 2 回の選択) を含む。ある特定の実施形態では
 、酵母またはファージの集団は、標識された抗原および抗体 / 断片 (例えば、s c F v)
 分子を使用する磁気ソーティング (M A C S) および / またはフローサイトメトリーソー
 ティングによって選択される。例えば、抗原は、ビオチンを抗原に共有結合性に結び付け
 ることによってビオチン化され (これはフルオロフォアにコンジュゲートされた二次薬剤
 、例えば、ストレプトアビジンによって検出可能である)、および / または I g G 分子 (10
 これは I g G に特異的な標識抗体によって検出される) に結合され、抗体 (例えば、s c
 F v) はエピトープタグ (例えば、赤血球凝集素または c - M y c) (これはエピトープ
 タグに対する蛍光標識抗体によって検出される) に結合される。一実施形態では、以下の
 選択ステップのうち少なくとも 3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つまたは 9 つを使用
 して、ネオエピトープ - M H C 複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を
 生成させる：(i) 標識されたネオエピトープ：M H C 複合体に結合する抗体保有クロー
 ン / 細胞の陽性選択 (例えば、標識されたネオエピトープ - M H C 複合体を介して選択す
 ることによる)、(i i) 対照ペプチド - M H C 複合体に結合する抗体保有クローン / 細胞
 の陰性選択 (選択除去) (例えば、標識された対照ペプチド - M H C 複合体による結合
 を受けない抗体保有クローン / 細胞を選択することによる)、(i i i) ネオエピトープ 20
 - M H C に結合する抗体保有クローンの陽性選択 (例えば、抗体 (例えば、s c F v) お
 よびネオエピトープ - M H C 複合体に関して二重陽性染色される抗体保有クローン / 細胞
 を選択することによる)、(i v) 標識されたネオエピトープ：M H C 複合体に結合する
 抗体保有クローン / 細胞の陽性選択 (例えば、標識されたネオエピトープ - M H C 複合体
 によって染色され、任意選択で、抗体に関して染色される抗体保有クローン / 細胞を選
 択することによる)、(v) 対照ペプチド - M H C 複合体または M H C 複合体単独に結合す
 る抗体保有クローン / 細胞の陰性選択 (選択除去) (例えば、標識された対照ペプチド -
 M H C 複合体または標識された M H C タンパク質による結合を受けない抗体保有クロー
 ン / 細胞を選択することによる)、(v i) ネオエピトープ - M H C に結合する抗体保有ク
 ローンの陽性選択 (例えば、ネオエピトープ - M H C 複合体に関して染色される抗体保有 30
 クローン / 細胞を選択することによるか、または抗体 (例えば、s c F v) 発現およびネ
 オエピトープ - M H C 複合体に関して二重陽性染色される抗体保有クローン / 細胞を選
 択することによる)、(v i i) M H C 複合体単独に結合する抗体保有クローン / 細胞の陰
 性選択 (選択除去) (例えば、標識された M H C タンパク質による結合を受けない抗体保
 有クローン / 細胞を選択することによる)、(v i i i) ネオエピトープ - M H C 複合体
 に結合する抗体保有クローン / 細胞の陽性選択 (例えば、抗体 (例えば、s c F v) およ
 びネオエピトープ - M H C 複合体に関して二重陽性染色される抗体保有クローン / 細胞を
 選択することによる)、(i x) M H C 複合体単独に結合する抗体保有クローン / 細胞の
 陰性選択 (選択除去) (例えば、標識された M H C タンパク質による結合を受けていない
 抗体保有クローン / 細胞を選択することによる)。一部の実施形態では、前の文に列挙さ 40
 れられているうちの少なくとも 5 つ、6 つ、7 つ、8 つまたは 9 つのステップが、少なく
 とも 2 つの陽性選択ステップおよび少なくとも 2 つの陰性選択ステップを含む、特異的抗体
 または断片の選択プロセスにおいて使用される。一部の実施形態では、少なくとも 6 つ、7
 つ、8 つまたは 9 つのステップが、ネオエピトープ - M H C 複合体に関する少なくとも 2
 つの (好ましくは少なくとも 3 つの) 陽性選択ステップ、対照ペプチド - M H C 複合体に
 結合するクローン / 細胞を選択除去するための少なくとも 1 つの (好ましくは少なくとも
 2 つの) 陰性選択ステップ、および M H C タンパク質単独に結合するクローン / 細胞を選
 択除去するための少なくとも 1 つの (好ましくは少なくとも 2 つの) 陰性選択ステップを
 含む、特異的抗体または断片の選択プロセスにおいて使用される。この態様の特定の実施
 形態では、M H C タンパク質は、M H C クラス I タンパク質 (例えば、H L A - A 2) で 50

ある。この態様の特定の実施形態では、ネオエピトープは、NPM1cネオエピトープである。特定の一実施形態では、ネオエピトープ：MHC複合体は、NPM1c：MHCクラスI（例えば、NPM1c：HLA-A2）である。この態様の一部の実施形態では、ネオエピトープは、本開示において参照されるいずれかのNPM1cエピトープ（例えば、AIQDLCLAV（配列番号1）のアミノ酸配列を有するエピトープ）である。特定の一実施形態では、ネオエピトープ：MHC複合体は、AIQDLCLAV：HLA-A2である。一部の実施形態では、ネオエピトープ：MHC複合体に対して特異的な抗体または抗原結合断片が、以下の付属書類1に記載されるいずれかの4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、またはすべての選択ステップを使用して得られる。一部の実施形態では、酵母表面ディスプレイまたはファージ表面ディスプレイ法およびライブラリーの代わりに、細菌ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、または無細胞（例えば、リボソームディスプレイ）抗体スクリーニング技術が使用される。酵母表面ディスプレイ法およびライブラリーは、当技術分野で公知である（例えば、Chao et al., 2006, Nature Protocols 1(2):755-768を参照）。ファージディスプレイ法およびライブラリーは、当技術分野で公知である。Merz et al. (1995) J Neurosci Methods 62(1-2):213-9; Di Niro et al. (2005) Biochem J 388(Pt 3):889-894; and Engberg et al. (1995) Methods Mol Biol 51:355-376.

10

【0078】

抗体

一態様では、MHCタンパク質（例えば、MHCクラスIタンパク質）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）ネオエピトープ（例えば、がんネオエピトープ）を含む抗原に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法のうちの1つによって（例えば、酵母表面ディスプレイ法、ファージディスプレイ法などによって特異的結合剤を同定するために複数回の選択ステップを使用して；任意選択で、二量体ネオエピトープ-MHC複合体を抗原として使用して；例えば、ネオエピトープ-MHC複合体または二量体ネオエピトープ-MHC複合体を抗体産生を誘発するための抗原として用いる免疫処置を対象に行うことを介して）得られるMHCタンパク質（例えば、MHCクラスIタンパク質）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）ネオエピトープ（例えば、がんネオエピトープ）を含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法のうちの1つによって得られる、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2、またはHLA-A*02アレルグループによってコードされるタンパク質）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）がんネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、MHCタンパク質単独には結合しないか、または実質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、MHCタンパク質と複合体を形成した対照ペプチドには結合しないか、または実質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一態様では、ネオエピトープ単独（MHCタンパク質を伴わない）には結合しないか、または実質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

20

30

40

【0079】

機能的MHCクラスI分子は、重鎖および2-ミクログロブリン鎖を含む。MHCクラスI分子によるペプチド結合は、ペプチドアミノ酸側鎖と、重鎖の1および2ドメインによって形成されるMHC分子のペプチド結合グループ内部の分散したポケットとの相互作用によって達成される。典型的には、ヒト白血球抗原（HLA）の場合、主な結合エネルギーは、ペプチドの位置2およびC末端の残基とMHC分子のそれぞれBおよびF結合ポケットとの相互作用に由来するが、ペプチド全域にわたる側鎖がMHCの結合能力を向上させるかまたは減じさせることができる（例えば、Guo, et al (1992) Nature 360:364; Silver et al (1992) Nature 360:367; Gorga et al (1992) Prot

50

eins 12;87; Madden (1995) Annu Rev Immunol 13:587; Madden et al (1993) Cell 75:693; Madden et al (1992) Cell 70:1035; Bjorkman, et al (1987) Nature 329:512; Saper et al (1991) J Mol Biol 219:277を参照)。9アミノ酸残基のペプチドの場合、C末端残基(位置9)は、MHC分子のF結合ポケットと相互作用する。

【0080】

MHC分子は極めて多型性であり、数千ものアレル変異体がクラスIIAおよびB座位で同定されている。多型のほとんどはペプチド結合ポケットに存在し、その結果、MHC分子は多岐にわたるペプチド結合特異性を有する。この多型性にもかかわらず、当技術分野では、HLAクラスII分子を、共通のペプチド結合特異性に基づいて、複数のグループ(すなわち、スーパータイプ)にまとめることができることが公知である。各グループ(スーパータイプ)は、「アンカー残基」またはMHC結合のために重要な残基であるペプチドの位置を反映するペプチドコンセンサス配列によって定義される。例えば、A2-スーパータイプのHLAクラスII分子(すなわち、HLA-A2、またはHLA-A*02アレルグループによってコードされるタンパク質)は、ペプチドの位置2に小型の脂肪族残基(例えば、アラニン、チロシン、セリン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン)、ならびにC末端に脂肪族残基(例えば、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン)または小型の疎水性残基(例えば、アラニン、バリン)を有するペプチドに対して、共通の特異的結合を有する(例えば、Sidney, et al (2008) BMC Immunology 9:1を参照)。

10

20

【0081】

ある特定の実施形態では、MHCクラスIIタンパク質、例えば、HLA-A2(例えば、NPM1c:HLA-A2)と複合体を形成した(またはそれによって提示される)急性骨髄性白血病(AML)関連変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に結合する(例えば、特異的に結合する)抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0082】

AMLのゲノム解析により、AMLは他のほとんどの成人がんよりも変異負荷が少なく、AML患者あたりのコーディング変異は平均13個であることが示されている(Ley et al., N Engl J Med 368: 2059 (2013); Alexandrov et al., NATURE 500: 415 (2013); Kandoth et al., NATURE 502 333 (2013)を参照)。しかし、AMLにおける体細胞変異は、しばしば同一の遺伝子に存在し(Ley et al., N Engl J Med 368: 2059 (2013); Papaemmanuil et al., N Engl J Med 374: 2209 (2016)を参照)、このため、これらのホットスポット変異に由来するネオ抗原は、腫瘍特異的免疫療法の魅力的な標的となっている(van der Lee et al., J CLIN INVEST 129: 774 (2019)を参照)。最もよく見られる変異の1つに、ヌクレオフォスミン(NPM1; NPM1によってコードされる)をコードする重要なドライバー遺伝子における4ヌクレオチド重複があり、これは成人AML患者全体の30~35%に存在する(Ley et al., N Engl J Med 368: 2059 (2013); Papaemmanuil et al., N Engl J Med 374: 2209 (2016); Falini et al., N Engl J Med 352: 254 (2005)を参照)。NPM1におけるそのような変異はその異常な細胞質局在をもたらし、この変異型タンパク質はNPM1cと称される。AMLに関連するNPM1c変異型タンパク質は、HLAクラスII拘束性であって、HLA-A*02:01アレルおよび他のいくつかのアレルを有する患者の白血病性芽球上に提示される白血病性ネオ抗原を生成する。例えば、NPM1cは、最も一般的なHLA-A*0201アレル(ヒト集団の約50%)によって提示される白血病特異的ネオ抗原エピトープ(AIQDLCLAV(配列番号1)、AIQと略記)を生じる(Greiner et al., BLOOD 120: 1282 (2012)を参照)。

30

40

【0083】

一部の態様では、MHCクラスIIタンパク質、例えば、HLA-A2と複合体を形成した(またはそれによって提示される)NPM1cネオエピトープを含む抗原に結合する抗

50

体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。NPM1cネオエピトープの長さは、MHCクラスI分子に結合するペプチドにとって妥当である任意の長さである。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは、5～20アミノ酸、6～19アミノ酸、7～18アミノ酸、8～17アミノ酸、8～16アミノ酸、8～15アミノ酸、8～15アミノ酸、8～14アミノ酸、8～13アミノ酸、8～12アミノ酸、9～12アミノ酸、または9～11アミノ酸である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5アミノ酸である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは12アミノ酸である。一部の実施形態では、NPM1cネオエピトープの長さは11アミノ酸である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは10アミノ酸である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは9アミノ酸である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープの長さは8アミノ酸である。一部の実施形態では、NPM1cネオエピトープは、10、15、20、30、40、50、または100アミノ酸残基長のポリペプチドの内部の、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5個の連続したアミノ酸のペプチドである。

10

【0084】

一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、HLA-A2であるMHCクラスIタンパク質に結合する。一部の態様では、HLA-A2に結合するNPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列の位置2が小型の脂肪族残基（例えば、アラニン、チロシン、セリン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、グルタミン）であって、アミノ酸配列のC末端残基が脂肪族残基（例えば、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン）または小型の疎水性残基（例えば、アラニン、バリン）である、アミノ酸配列を含む。一部の態様では、HLA-A2に結合するNPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列の位置2がバリン、イソロイシンまたはロイシンであって、アミノ酸配列のC末端残基がバリン、ロイシン、またはイソロイシンである、アミノ酸配列を含む。NPM1cネオエピトープが8アミノ酸残基長である、一部の態様では、C末端アミノ酸は位置8である。NPM1cネオエピトープが9アミノ酸残基長である、一部の態様では、C末端アミノ酸は位置9である。NPM1cネオエピトープが10アミノ酸残基長である、一部の態様では、C末端アミノ酸は位置10である。NPM1cネオエピトープが11アミノ酸残基長である、一部の態様では、C末端アミノ酸は位置11である。NPM1cネオエピトープが12アミノ酸残基長である、一部の態様では、C末端アミノ酸は位置12である。

20

30

【0085】

HLA-A2に結合する、NPM1cに由来するネオエピトープは、当技術分野で公知である。例えば、Greiner (2012) Blood 120:1282は、AIQDLC LAV（配列番号1）およびAIQDLCVAV（配列番号71）を含む、HLA-A2に結合する9merのNPM1cネオエピトープのアミノ酸配列を同定している。さらなる一例として、van der Lee (2019) J Clin Invest 129:774は、CLAVEEVSL（配列番号72）を含む、HLA-A2クラスI分子に結合するNPM1cネオエピトープのアミノ酸配列、さらには、VEEVSLRK（配列番号73）、AVEEVSLR（配列番号74）、AVEEVSLRK（配列番号75）、およびCLAVEEVSLRK（配列番号76）を含む、他のHLAハプロタイプによってコードされるMHCクラスI分子に結合するNPM1cネオエピトープのアミノ酸配列を同定している。

40

【0086】

一部の態様では、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c:HLA-A2）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）変異型ヌクレオフォスミンタンパク質のネオエピトープを含む抗原に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体およびその抗原結合断片であって、ヌクレオフォスミンタンパク質における変異が、ヌクレオフォスミンをコードする遺伝子における4ヌクレオチド重複に起因する、抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c:HLA-A2）と複合体を形成した（またはそれによって提示され

50

る)細胞質性(細胞質中に位置する)変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に結合する(例えば、特異的に結合する)抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、ネオエピトープは、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、ネオエピトープは、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質の10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基に由来する、8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、ネオエピトープは、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質のC末端の10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基に由来する、8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質は、配列番号56によって示されるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質は、野生型ヌクレオフォスミンのアミノ酸配列(例えば、配列番号54)に比して1つまたは複数の変異(例えば、挿入、欠失、置換)を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、配列番号56のアミノ酸配列を含むタンパク質に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、野生型ヌクレオフォスミンのアミノ酸配列(例えば、配列番号54)に比して1つまたは複数の変異(例えば、挿入、欠失、置換)を有するアミノ酸配列を含むタンパク質に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、配列番号56によって示されるアミノ酸配列の10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、野生型ヌクレオフォスミンのアミノ酸配列(例えば、配列番号54)に比して1つまたは複数の変異(例えば、挿入、欠失、置換)を有するアミノ酸配列を有するタンパク質に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドであって、1つまたは複数の変異は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基長のタンパク質の領域内にあり、ネオエピトープは、1つまたは複数の変異を含むタンパク質の領域に由来する。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、配列番号56によって示されるアミノ酸配列を有するタンパク質のC末端の10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープは、野生型ヌクレオフォスミンのアミノ酸配列(例えば、配列番号54)に比して1つまたは複数の変異(例えば、挿入、欠失、置換)を有するアミノ酸配列を有するタンパク質に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドであって、1つまたは複数の変異は、C末端の近位(例えば、C末端から約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100アミノ酸残基)にあるタンパク質の領域内にあり、ネオエピトープは、1つまたは複数の変異を含むタンパク質の領域に由来する。一部の態様では、MHCクラスIIタンパク質(例えば、HLA-A2タンパク質)と複合体を形成した(またはそれによって提示される)配列番号56のアミノ酸配列を含むタンパク質のネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0087】

一部の態様では、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質は、C末端アミノ酸配列MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK(配列番号57)を含む。一部の態様では、MH

CクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2タンパク質）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）C末端アミノ酸配列MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK（配列番号57）を含むNPM1cタンパク質のネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、ネオエピトープは、NPM1cタンパク質のC末端アミノ酸配列MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK（配列番号57）に由来する8、9、10、11、または12アミノ酸のペプチドである。一部の態様では、HLA-A2タンパク質またはHLA-A*02アレルグループによってコードされるタンパク質（すなわち、NPM1c:HLA-A2）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）NPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、NPM1cはヒトNPM1cである。

10

【0088】

一部の態様では、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2タンパク質またはHLA-A*02アレルグループによってコードされるタンパク質）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）細胞質性変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体またはその抗原結合断片であって、ネオエピトープのアミノ酸配列が、AIQDLC LA V（配列番号1）、AIQDLC VAV（配列番号71）、CLAVEEVSL（配列番号72）、VEEVSLRK（配列番号73）、AVEEVSLR（配列番号74）、AVEEVSLRK（配列番号75）またはCLAVEEVSLRK（配列番号76）を含む、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、HLA-A2によって提示されるAIQDLC LA V（配列番号1）、AIQDLC VAV（配列番号71）、CLAVEEVSL（配列番号72）、VEEVSLRK（配列番号73）、AVEEVSLR（配列番号74）、AVEEVSLRK（配列番号75）およびCLAVEEVSLRK（配列番号76）から選択されるアミノ酸配列を含む抗原に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、HLA-A2によって提示されるアミノ酸配列AIQDLC LA V（配列番号1）を含む抗原に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

20

【0089】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、MHCクラスIタンパク質単独および/またはMHCクラスIタンパク質と複合体を形成した対照ペプチド（例えば、対照ペプチドは、ネオエピトープと同じ数のアミノ酸を有するが、ネオエピトープの由来となったタンパク質とは異なるタンパク質に由来する）には結合しないか、または実質的に結合しない。

30

【0090】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞質性変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープ単独（MHCクラスIタンパク質、例えば、HLA-A2を伴わない）には結合しないか、または実質的に結合しない。

【0091】

一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列AIQDLC LA V（配列番号1）を含み、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A2タンパク質（例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）である。一部の態様では、NPM1cネオエピトープは、AIQDLC VAV（配列番号71）、CLAVEEVSL（配列番号72）、VEEVSLRK（配列番号73）、AVEEVSLR（配列番号74）、AVEEVSLRK（配列番号75）およびCLAVEEVSLRK（配列番号76）から選択されるアミノ酸配列を含み、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A2タンパク質（例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）である。

40

【0092】

一部の態様では、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質と複合体

50

を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) を含むネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸は置換されている、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V を含むネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗原およびその抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸は置換されている、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。一部の態様では、アミノ酸置換は、A I Q D L C L A V 配列 (配列番号 1) における既存の残基と類似のサイズのアミノ酸残基による置換である。一部の態様では、アミノ酸置換は、本明細書に記載される抗体およびその抗原結合断片の抗原への結合に影響しない (または実質的に影響しない)。

10

【0093】

一部の態様では、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V を含むネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちの 1 つ、2 つ、またはより多くのアンカー残基が置換されている (例えば、配列番号 1 の位置 2 および / または位置 9、例えば、A I Q D L C L A V (配列番号 1) の下線が付された残基)、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、アミノ酸置換は、本明細書に記載される抗体およびその抗原結合断片の抗原への結合、またはクラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質 (例えば、H L A - A 2) へのネオエピトープの結合に影響しない (または実質的に影響しない)。一部の態様では、A I Q D L C L A V (配列番号 1) の第 2 位にあるアミノ酸残基 I は、アミノ酸残基 L (ロイシン) で置換されている。一部の実施形態では、A I Q D L C L A V (配列番号 1) の第 2 位にあるアミノ酸残基 I は、アミノ酸残基 V (バリン)、M (メチオニン)、チロシン (T)、セリン (S)、グルタミン (Q) または A (アラニン) で置換されている。一部の実施形態では、A I Q D L C L A V (配列番号 1) の第 9 位にあるアミノ酸残基 V は、アミノ酸残基 I (イソロイシン)、L (ロイシン)、M (メチオニン)、または A (アラニン) で置換されている。

20

30

【0094】

一部の態様では、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V を含むネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸は置換されており、置換は保存的アミノ酸置換である、抗体またはその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、MHC クラス I タンパク質と複合体を形成した、表 1 に特定されているアミノ酸配列を含むネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0095】

40

50

【表 1】

表1: AIQ ネオエピトープの保存的置換

| 配列の名称 | 配列 | | | | | | | | | 配列番号 |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|
| AIQ 残基 | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | X ₅ | X ₆ | X ₇ | X ₈ | X ₉ | |
| AIQ ネオエピトープ | A | I | Q | D | L | C | L | A | V | 1 |
| 残基 X ₁ の保存的置換 | <u>V</u> | I | Q | D | L | C | L | A | V | 77 |
| | <u>L</u> | I | Q | D | L | C | L | A | V | 78 |
| | <u>I</u> | I | Q | D | L | C | L | A | V | 79 |
| 残基 X ₃ の保存的置換 | A | I | <u>N</u> | D | L | C | L | A | V | 80 |
| 残基 X ₄ の保存的置換 | A | I | Q | <u>E</u> | L | C | L | A | V | 81 |
| 残基 X ₅ の保存的置換 | A | I | Q | D | <u>I</u> | C | L | A | V | 82 |
| | A | I | Q | D | <u>V</u> | C | L | A | V | 83 |
| | A | I | Q | D | <u>M</u> | C | L | A | V | 84 |
| | A | I | Q | D | <u>A</u> | C | L | A | V | 85 |
| | A | I | Q | D | <u>F</u> | C | L | A | V | 86 |
| 残基 X ₆ の保存的置換 | A | I | Q | D | L | <u>S</u> | L | A | V | 87 |
| | A | I | Q | D | L | <u>A</u> | L | A | V | 88 |
| 残基 X ₇ の保存的置換 | A | I | Q | D | L | C | <u>I</u> | A | V | 89 |
| | A | I | Q | D | L | C | <u>V</u> | A | V | 90 |
| | A | I | Q | D | L | C | <u>M</u> | A | V | 91 |
| | A | I | Q | D | L | C | <u>A</u> | A | V | 92 |
| | A | I | Q | D | L | C | <u>F</u> | A | V | 93 |
| 残基 X ₈ の保存的置換 | A | I | Q | D | L | C | L | <u>V</u> | V | 94 |
| | A | I | Q | D | L | C | L | <u>L</u> | V | 95 |
| | A | I | Q | D | L | C | L | <u>I</u> | V | 96 |

10

20

【0096】

一部の態様では、本開示は、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に特異的に結合する抗体または抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸が置換されており、抗体または抗原結合断片が、MHC クラス I タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に対して同じまたは実質的に同じ結合親和性を有する、抗体または抗原結合断片を提供する。一部の態様では、本開示は、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片であって、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸は置換されており、抗体およびその抗原結合断片は、MHC クラス I タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に対して、同じまたはより良好な親和性で特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片を提供する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体およびその抗原結合断片は、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に結合し、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸は置換されており、抗体または抗原結合断片は、0.1 ~ 100 nM (例えば、0.1 ~ 50 nM、0.1 ~ 25 nM、10.1 ~ 15 nM) の K_D を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体およびその抗原結合断片は、クラス I 主要組織適合複合体 (MHC クラス I) タンパク質と複合体を形成したアミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) に結合し、アミノ酸配列 A I Q D L C L A V (配列番号 1) のうちのいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸は置換されており、抗体およびその抗原結合断片は、100 nM 未満 (例えば、50 nM 未満、25 nM 未満、15 nM 未満、7 nM 未満、6 nM 未満、5 nM 未満、4 nM 未満、3 nM 未満、2 nM 未満、1 nM 未満、0.9 n

30

40

50

M未満、0.8 nM未満、0.7 nM未満、0.6 nM未満、0.5 nM未満、0.4 nM未満、0.3 nM未満、0.2 nM未満、または0.1 nM未満)のK_Dで結合する。

【0097】

一部の態様では、MHCクラスIタンパク質、例えば、HLA-A2(NPM1c:HLA-A2)によって提示されるNPM1cエピトープに結合し、抗がん効果または抗腫瘍効果(例えば、*in vivo*の抗がん効果、任意選択で、がんはAMLである)を有する抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0098】

一部の態様では、本開示は、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片であって、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む抗体、またはその抗原結合断片を提供する。一部の態様では、ネオエピトープは、AIQDLCLAV(配列番号1)を含むアミノ酸配列を含む。一部の態様では、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A*02アレルグループを含むHLA-Aアレルによってコードされる。一部の態様では、HLA-AアレルはHLA-A*02:01である。

10

【0099】

一部の態様では、本明細書に記載される重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を有する(例えば、YG1 scFVの重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の配列を有する、例えば、配列の項および実施例を参照)抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、本明細書に記載される1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有する(例えば、YG1 scFVのCDRを有する。例えば、配列の項および実施例を参照)抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、NPM1c:HLA-A2に結合する抗体、またはその抗原結合断片は、scFVである。NPM1c:HLA-A2に特異的に結合するscFVの例示的なアミノ酸配列は、配列番号2に示されている。一部の態様では、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するscFVが、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するscFVであって、配列番号2に示されるアミノ酸配列との同一性の違いの少なくとも95%が、scFVのフレームワーク領域にある(または相補性決定領域(CDR)にはない)scFVが、本明細書において提供される。

20

30

【0100】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号5(YG1 scFVの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列)を有するVHを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号5に示されるアミノ酸配列(YG1 scFVの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVHを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号5に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVHであって、配列番号5に示されるアミノ酸配列との同一性における違いの少なくとも95%が、VHのフレームワーク領域にある(または相補性決定領域(CDR)にはない)VHが、本明細書において提供される。

40

【0101】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号3(YG1 scFVの軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列)を有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結

50

合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号3に示されるアミノ酸配列（Y G 1 s c F vの軽鎖可変領域（V L）のアミノ酸配列）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するV Lを含む抗N P M 1 c : H L A - A 2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号3に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するV Lであって、配列番号3に示されるアミノ酸配列との同一性における違いの少なくとも95%またはすべてが、V Lのフレームワーク領域にある（または相補性決定領域（C D R）にはない）V Lが、本明細書において提供される。

10

【0102】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号5（Y G 1 s c F vの重鎖可変領域（V H）のアミノ酸配列）を有するV H、およびアミノ酸配列配列番号3（Y G 1 s c F vの軽鎖可変領域（V L）のアミノ酸配列）を有するV Lを含む抗N P M 1 c : H L A - A 2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、配列番号5に示されるアミノ酸配列（Y G 1 s c F vの重鎖可変領域（V H）のアミノ酸配列）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するV H、および配列番号3に示されるアミノ酸配列（Y G 1 s c F vの軽鎖可変領域（V L）のアミノ酸配列）と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するV Lを含む抗N P M 1 c : H L A - A 2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、それぞれ配列番号5および配列番号3に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するV HおよびV Lであって、配列番号5および配列番号3に示されるアミノ酸配列との同一性における違いの少なくとも95%またはすべてが、V HおよびV Lのフレームワーク領域にある（または相補性決定領域（C D R）にはない）V HおよびV Lが、本明細書において提供される。

20

【0103】

本開示の抗体または抗原結合断片のC D Rは、当技術分野において、K a b a t、C h o t h i a、A b M、C o n t a c t、およびI M G Tを含む様々な方法で定義されている。

30

【0104】

一部の態様では、本開示の抗体のC D Rは、K a b a tシステムに従って定義され、これは配列可変性に基づく（例えば、Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391; Kabat EA et al, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照。K a b a t C D Rの位置は、当技術分野で公知の方法に従って決定される。一態様では、本明細書に記載される抗体およびその断片のC D Rは、K a b a tシステムを使用して決定される。一部の態様では、K a b a tシステムを使用して決定される、Y G 1 s c F vの1つまたは複数の相補性決定領域（C D R）を有する抗N P M 1 c : H L A - A 2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

40

【0105】

一部の態様では、本開示の抗体のC D Rは、C h o t h i aシステムに従って定義され、これは免疫グロブリン構造ループ領域の位置に基づく（例えば、Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; T ramontano A et al, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; および米国特許第7

50

、709、226号明細書を参照)。「Chothia CDR」という用語および同様の用語は、当技術分野で認識されており、Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917の方法に従って決定される抗体CDR配列を指し、これを本明細書では「Chothia CDR」と称する(例えば、米国特許第7,709,226号明細書およびMartin, A., "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Diibel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)を参照)。Chothia CDRの位置は、当技術分野で公知の方法に従って決定される。一部の態様では、本明細書に記載される抗体およびその断片のCDRは、Chothiaシステムを使用して決定される。一部の態様では、Chothiaシステムを使用して決定される、YG1 scFvの1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有する抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。 10

【0106】

一部の態様では、本開示の抗体のCDRは、AbMシステムに従って定義され、これはKabatt CDRとChothia構造ループとの折衷案に相当するAbM超可変領域に基づいており、CDRはOxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェア(Oxford Molecular Group, Inc.)を使用して決定される。AbM CDRの位置は、当技術分野で公知の方法に従って決定される。一態様では、本明細書に記載される抗体およびその断片のCDRは、AbMシステムを使用して決定される。一部の態様では、AbMシステムを使用して決定される、YG1 scFvの1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有する抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。 20

【0107】

一部の態様では、本開示の抗体のCDRは、IMGTシステムに従って定義される(IMGT(登録商標)、international Immunogenetics information system(登録商標)のウェブサイトimgt.org, founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Franceを参照;例えば、Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136およびLefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212を参照。これらは両方ともその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。IMGT CDRの位置は、当技術分野で公知の方法に従って決定される。一態様では、本明細書に記載される抗体のおよびその断片CDRは、IMGTシステムを使用して決定される。一部の態様では、IMGTシステムを使用して決定される、YG1 scFvの1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有する抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。 30

【0108】

一部の態様では、本開示の抗体のCDRは、Contactシステムに従って定義される。Contactの定義は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく(bioinf.org.uk/abs)(MacCallum RM et al., (1996) J Mol Biol 5: 732-745を参照;例えば、Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Diibel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)も参照のこと)。Contact CDRの位置は、当技術分野で公知の方法に従って決定される。一態様では、本明細書に記載される抗体およびその断片のCDRは、Contactシステムを使用して決定される。一部の態様では、Contactシステムを使用して決定される、YG1 scFvの1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を有する抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。 40

【0109】

一部の態様では、HLA-A2によって提示されるNPM1cエピトープに特異的に結合し、上記のシステムのいずれかに従って定義される、YG1 scFvの1つ、2つ、 50

もしくは3つのVH CDRおよび/または1つ、2つ、もしくは3つのVL CDRを含む抗体またはその断片が、本明細書において提供される。例えば、一実施形態では、HLA-A2によって提示されるNPM1cエピトープに特異的に結合し、IMGTによって定義される、YG1 scFvの1つ、2つ、もしくは3つすべてのVH CDRおよび/または1つ、2つ、もしくは3つすべてのVL CDRを含む抗体またはその断片が、本明細書において提供される。

【0110】

当技術分野で公知であるように、VHおよびVLは、フレームワーク領域によって囲まれたCDRを含有する(CDRおよびFR配列は、VHおよびVLにおいて以下の順序で出現する: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4)。任意選択で、フレームワーク領域はヒトフレームワーク領域である。

10

【0111】

ある特定の態様では、アミノ酸配列配列番号5(YG1 scFvの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列)を有するVHの1つ、2つまたは3つすべてのVH CDRを有するVHを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、IMGTによって定義される、アミノ酸配列配列番号5を有する重鎖可変領域(VH)の1つ、2つ、または3つすべてのVH CDRを有するVHを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

【0112】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号3(YG1 scFvの軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列)を有するVLの1つ、2つまたは3つすべてのVL CDRを有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、IMGTによって定義される、アミノ酸配列配列番号3(YG1 scFvの軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列)を有するVLの1つ、2つまたは3つすべてのVL CDRを有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

20

【0113】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号5(YG1 scFvの重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列)を有するVHの1つ、2つまたは3つすべてのVH CDRを有するVH、およびアミノ酸配列配列番号3(YG1 scFvの軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列)を有するVLの1つ、2つまたは3つすべてのVL CDRを有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

30

【0114】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号9のVH CDR1、アミノ酸配列配列番号10のVH CDR2、および/またはアミノ酸配列配列番号11のVH CDR3を有する重鎖可変領域(VH)を含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸配列配列番号9のVH CDR1、アミノ酸配列配列番号10のVH CDR2、およびアミノ酸配列配列番号11のVH CDR3を有する重鎖可変領域(VH)を含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片であって、配列番号9、配列番号10、または配列番号11の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸が置換されている抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸置換は保存的置換である。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、類似のサイズのアミノ酸残基による置換である。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片の抗原への結合に影響せず(または実質的に影響せず)、または改善もしない。

40

【0115】

一部の態様では、アミノ酸配列番号6の軽鎖可変領域(VL)CDR1、アミノ酸配列

50

配列番号7のVL CDR2、および/またはアミノ酸配列配列番号8のVL CDR3を有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸配列番号6の軽鎖可変領域(VL)CDR1、アミノ酸配列配列番号7のVL CDR2、および/またはアミノ酸配列配列番号8のVL CDR3を有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片であって、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸が置換されている、抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、アミノ酸置換は保存的置換である。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、類似のサイズのアミノ酸残基による置換である。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片の抗原への結合に影響を及ぼさない(または実質的に影響を及ぼさない)か、または改善する。

10

【0116】

一部の態様では、アミノ酸配列配列番号9の重鎖可変領域(VH)CDR1、アミノ酸配列配列番号10のVH CDR2、およびアミノ酸配列配列番号11のVH CDR3を有するVH、ならびに/またはアミノ酸配列配列番号6の軽鎖可変領域(VL)CDR1、アミノ酸配列配列番号7のVL CDR2、およびアミノ酸配列配列番号8のVL CDR3を有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列配列番号9の重鎖可変領域(VH)CDR1、アミノ酸配列配列番号10のVH CDR2、およびアミノ酸配列配列番号11のVH CDR3を有するVH、ならびにアミノ酸配列配列番号6の軽鎖可変領域(VL)CDR1、アミノ酸配列配列番号7のVL CDR2、およびアミノ酸配列配列番号8のVL CDR3を有するVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるVHおよびVLを含む抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片であって、VHおよび/またはVL CDRの1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸が置換されている、抗NPM1c:HLA-A2抗体およびその抗原結合断片が、本明細書において提供される。

20

【0117】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体または断片のVHおよび/またはVL領域における1つまたは複数のCDRは、NPM1c:HLA-A2への特異的結合が維持される限り、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸が異なってもよい。

30

【0118】

一部の態様では、本明細書に提供される抗体または断片は、親和性成熟しており、すなわち、記載される抗体または断片と比較して、1つまたは複数の相補性決定領域において1つまたは複数の変更を有し、そのような1つまたは複数の変更は、記載される抗体または断片に比して、抗原に対する抗体または断片の親和性の改善をもたらす。一部の態様では、本明細書に提供される抗体または断片は、抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、100nM未満(例えば、50nM未満、25nM未満、15nM未満、7nM未満、6nM未満、5nM未満、4nM未満、3nM未満、2nM未満、1nM未満、0.9nM未満、0.8nM未満、0.7nM未満、0.6nM未満、0.5nM未満、0.4nM未満、0.3nM未満、0.2nM未満、または0.1nM未満)のKdを有する。一部の態様では、本明細書に提供される抗体または断片は、抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、15nM未満、10nM未満、7nM未満、5nM未満、または1nM未満(例えば、0.01から15nM、0.01から10nM、0.01から7nM、0.01から5nM、0.01から1nM、0.1から15nM、0.1から10nM、0.1から7nM、0.1から5nM、0.1から1nM、1から15nM、1から10nM、1から7nM、1から5nM、5から15nM、5から10nM、または5から7nM)のKdを有する。

40

【0119】

50

とも 91% の配列同一性、または少なくとも 92% の配列同一性、または少なくとも 93% の配列同一性、または少なくとも 94% の配列同一性、または少なくとも 95% の配列同一性、または少なくとも 96% の配列同一性、または少なくとも 97% の配列同一性、または少なくとも 98% の配列同一性、または少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様では、V L C D R 3 は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性、または少なくとも 81% の配列同一性、または少なくとも 82% の配列同一性、または少なくとも 83% の配列同一性、または少なくとも 84% の配列同一性、または少なくとも 85% の配列同一性、または少なくとも 86% の配列同一性、または少なくとも 87% の配列同一性、または少なくとも 88% の配列同一性、または少なくとも 89% の配列同一性、または少なくとも 90% の配列同一性、または少なくとも 91% の配列同一性、または少なくとも 92% の配列同一性、または少なくとも 93% の配列同一性、または少なくとも 94% の配列同一性、または少なくとも 95% の配列同一性、または少なくとも 96% の配列同一性、または少なくとも 97% の配列同一性、または少なくとも 98% の配列同一性、または少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0121】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、単離された抗体または断片である。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、精製された抗体または断片である。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、例えば、電気泳動（例えば、SDS - PAGE、等電点電気泳動またはキャピラリー電気泳動による）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換または逆相 HPLC）法による決定で、95% を上回る、97% を上回る、98% を上回る、または 99% を上回る純度に精製される（例えば、Flatman, et al., J. Chromatogr. 848:79-87 (2007) を参照）。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c : HLA - A2 に特異的に結合する単離された抗体または断片である。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c : HLA - A2 に特異的に結合する精製された抗体または断片である。一部の態様では、NPM1c ネオエピトープは、本明細書に記載されるいずれか 1 つである。一部の態様では、NP1M1c ネオエピトープは A I Q D L C L A V（配列番号 1）である。

20

30

【0122】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、抗原（例えば、NPM1c : MHC クラス I）に対して少なくとも 10^{-7} M の結合親和性（Kd）を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c : MHC クラス I 抗原（例えば、NPM1c : HLA - A2）に対して、少なくとも 10^{-7} M もしくはより強い、少なくとも 10^{-8} M もしくはより強い、少なくとも 10^{-9} M もしくはより強い、少なくとも 500 nM もしくはより強い、少なくとも 250 nM もしくはより強い、少なくとも 100 nM もしくはより強い、少なくとも 50 nM もしくはより強い、少なくとも 25 nM もしくはより強い、少なくとも 20 nM もしくはより強い、少なくとも 15 nM もしくはより強い、または少なくとも 10 nM もしくはより強い結合親和性（Kd）を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c : MHC クラス I 抗原（例えば、NPM1c : HLA - A2）に対して、少なくとも約 25 nM もしくはより強い、少なくとも約 15 nM もしくはより強い、または少なくとも約 10 nM もしくはより強い結合親和性（Kd）を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c : MHC クラス I 抗原（例えば、NPM1c : HLA - A2）に対して、0.1 nM と 500 nM、0.1 nM と 100 nM、0.5 nM と 100 nM、0.1 nM と 50 nM、0.5 nM と 50 nM、0.1 nM と 25 nM、0.5 nM と 25 nM、0.1 nM と 15 nM、0.5 nM と 15 nM、0.1 nM と 10 nM、もしくは 0.5 nM と 10 nM の間（または前の値から後の値まで）、または 1 nM から 100 nM（またはその間の

40

50

任意の値)の結合親和性(K_d)を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、約0.1nMと約100nMの間(または前の値から後の値まで)または約0.5nMから約100nMの結合親和性(K_d)を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、約0.1nMと約50nMの間(または前の値から後の値まで)または約0.5nMから約50nMの結合親和性(K_d)を有する。

【0123】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、少なくとも $0.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ またはより高い K_{on} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、少なくとも $1 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ またはより高い K_{on} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、少なくとも $2.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ またはより高い K_{on} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、少なくとも $5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ またはより高い K_{on} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $0.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ と $50 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ の間(または前の値から後の値まで)の K_{on} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $1 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ と $10 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ M s}^{-1}$ の間(または前の値から後の値まで)の K_{on} を有する。

【0124】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $50 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $10 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $5 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $0.5 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ と $50 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の間(または前の値から後の値まで)の K_{off} を有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NPM1c:MHCクラスI抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対して、 $between 1 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ と $15 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の間(または前の値から後の値まで)の K_{off} を有する。

【0125】

一部の態様では、本明細書に記載される抗体は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。一部の態様では、本明細書に記載される抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体である。一部の態様では、ヒト抗体またはヒト抗体の抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、ヒト化抗体またはヒト化抗体の抗原結合断片が、本明細書において提供される。一部の態様では、キメラ抗体またはキメラ抗体の抗原結合断片(キメラ抗体は、1つの種の可変領域および別の種の定常領域を有する抗体である)が、本明細書において提供される。

【0126】

本明細書に提供される抗体としては、抗原（例えば、NPM1c : HLA - A2）に特異的に結合する免疫グロブリン分子、および抗体と同じまたは実質的に同じ抗原のエピトープに結合するそのような分子の免疫学的活性断片が挙げられる。一部の態様では、抗体、またはその抗原結合断片による結合を受けた抗原は、がん細胞の表面上のMHCクラスI分子（例えば、HLA - A2）によって提示される。一部の実施形態では、がん細胞はAML細胞である。

【0127】

一部の態様では、抗NPM1c : HLA - A2抗体は、本明細書に記載される3つのVH CDRおよび/または3つのVL CDR、ヒトまたはヒト由来のフレームワーク領域、ならびにヒトまたはヒト由来の定常領域を含む、ヒト抗体もしくはヒト化抗体または免疫グロブリンである。ヒトフレームワーク領域の非限定的な例は、当技術分野で記載されており、例えば、Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Sims et al. J. Immunol. 151 :2296 (1993); Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol., 151 :2623 (1993); Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008); Baca et al., J. Biol. Chem. 272: 10678-10684 (1997); Rosok et al., J. Biol. Chem. 271 :22611-22618 (1996); Chothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998)を参照。好ましくは、本明細書に記載される抗体のNPM1c : HLA - A2への結合を改善するために、1つまたは複数のアミノ酸置換をフレームワーク領域に加えることができる。

【0128】

抗体が免疫グロブリンである一部の態様では、使用し得る抗体のタイプとして、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgYが挙げられるが、これらに限定されない。使用し得る抗体のクラスとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2が挙げられるが、これらに限定されない。一部の態様では、抗体はIgG抗体である。一部の実施形態では、抗体はIgG1抗体またはIgG4抗体である。一部の態様では、抗体は、野生型IgG1重鎖定常領域を含む。一部の態様では、抗体は、野生型IgG4重鎖定常領域を含む。一部の態様では、抗体は、変異型IgG1重鎖定常領域を含む。一部の態様では、抗体は、変異型IgG4重鎖定常領域を含む。一部の態様では、変異型IgG4重鎖定常領域は、EU番号付けによる置換S228P、L235E、L235A、またはそれらの組合せのうちのいずれか1つを含む。一部の態様では、抗体は、少なくとも1つの変異を含むFcドメインを含む。

【0129】

一部の態様では、単鎖抗体、例えば、単鎖Fv (scFv) が、本明細書において提供される。一部の態様では、scFvは、ヒトscFvまたはヒト化scFvである。一部の態様では、scFvはリンカーを含む。一部の態様では、リンカーはペプチドリンカーである。一部の態様では、ペプチドリンカーはGly - Serリンカーである。一部の態様では、Gly - Serリンカーは、(Gly4Ser)1 (配列番号58)、(Gly4Ser)2 (配列番号59)、(Gly4Ser)3 (配列番号60)、および(Gly4Ser)4 (配列番号61) からなる群から選択される。一部の態様では、Gly - Serリンカーは、アミノ酸配列SGSSGGSSSG (配列番号4) を含む。一部の態様では、抗体の抗原結合断片であって、断片は、限定されないが、Fv断片、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、またはジスルフィド連結Fv (sdFv) であり得る、抗体の抗原結合断片が、本明細書において提供される。一実施形態では、Fv断片が本明細書において提供される。一実施形態では、Fab断片が本明細書において提供される。一実施形態では、F(ab')断片が本明細書において提供される。一実施形態では、F(ab')₂断片が本明細書において提供される。

【0130】

10

20

30

40

50

一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、そのような抗体または断片によって標的化されるがん細胞に対する細胞傷害を誘導することができ、細胞傷害は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、補体依存性細胞傷害（CDC）、またはそのような抗体もしくは断片に結合した毒素もしくは薬物の細胞傷害性に起因するものであり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、ADCC、ADCPおよびCDCを有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、ADCCおよびADCPを有する。一部の態様では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、ADCC活性のみまたはCDC活性のみを有する。

【0131】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）および/または抗体依存性細胞食作用（ADCP）を媒介する。ADCCおよび/またはADCP機能を有する抗体を製造する方法は、当技術分野で公知である。一般に、抗体のFc領域は、ADCCにつながる好中球、マクロファージ、NK細胞、好酸球およびマスト細胞上のFc受容体へのその結合、ならびにADCPにつながるマクロファージ、好中球および樹状細胞上のFc受容体へのその結合を媒介する。一部の態様では、ADCC活性を有する抗体であって、抗体のFc領域がヒトIgGまたはIgEタイプである抗体が、本明細書において提供される。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG1アイソタイプのものである。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG2アイソタイプのものである。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG3アイソタイプのものである。抗体を、そのADCCおよび/またはADCP活性が増加するように生物工学的に操作することができる（例えば、変異、架橋、ジスルフィド結合形成、またはオリゴ糖付加による）（例えば、Natsume et al., 2009, Drug Des Devel Ther. 3:7-16を参照。これは参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、抗体のFc領域のCH2および/またはCH3ドメインは、ADCCおよび/またはADCP活性を改善する目的でフコース残基を減少させるかまたは除去するために、それらのグリコシル化部位で改変される（例えば、Liu et al., 2015, Ca Immunol. Res. 3:173-183; Satoh et al., 2006, Expert Opin Biol. Ther. 6:1161-1173を参照；これは両方とも参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、ヒトIgG1アイソタイプのFc領域は、CH2ドメインの位置333でアラニン置換により変異している。一実施形態では、ヒトIgG1アイソタイプのFc領域は、以下の残基で変異している：S239D、I332E、およびA330L（例えば、Lazar et al., 2006, PNAS 103:4005-4010を参照。これは参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、ヒトIgG1アイソタイプのFc領域は、以下の残基に変異している：S239D、I332E、およびG236A（例えば、Richards et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7:2517-27を参照）。一実施形態では、Fc領域は、位置298、333および/または334（EU番号）にアミノ酸置換を含み、これにより、ADCC活性が改善される。

【0132】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する。CDC機能を有する抗体を製造方法は、当技術分野で公知である。一部の態様では、CDC活性を有する抗体であって、抗体のFc領域がヒトIgGまたはIgMタイプである抗体が、本明細書において提供される。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG1アイソタイプのものである。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG2アイソタイプのものである。一実施形態では、想定される抗体のFc領域は、IgG3アイソタイプのものである。抗体を、そのCDC活性を増加させるように生物工学的に操作する（例えば、変異させる）ことができる（例えば、Moore et al., 2010, MAbs 2(2):181-189; Idusogie et al., 2001, J Immunol. 166(4):2571-5; Natsume et al., 2009, Drug Des Devel Ther. 3:7-16を参照；これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、IgG

10

20

30

40

50

Fcを有する抗体を、そのFc領域で、そのグリコシル化部位におけるN-グリカン構造が、フコースおよびシアル酸残基を伴わないN-アセチルグルコサミンで終結するG0グリカン型に変化するように生物工学的に操作する。一実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号明細書、国際公開第99/51642号パンフレット、またはIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記載されているように、CDC活性を改善するために、Fc領域を改変する。

【0133】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞傷害性薬剤（例えば、毒素または薬物）に結合される。細胞傷害性薬剤は、細胞死を誘導するか、または重要な細胞機能を阻害する薬剤であり得る。細胞傷害性薬剤は、化学療法剤、増殖阻害剤、放射性同位体、または毒素であり得るが、これらに限定されない。一実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、毒素（例えば、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、ジアンチンタンパク質、ニガウリ (*momordica charantia*) 阻害剤、クロチン、ゲロニン、ネオマイシン、トリコテセン、フェノマイシン、ミトゲリン、レストリクトシン、サボンソウ (*sapaonaria officinalis*) 阻害剤、クルシン、ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca Americana*) タンパク質、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、またはサルシン) に結合される（例えば、コンジュゲートされる）。一実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、放射性同位元素（例えば、 P^{32} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 At^{211} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、または Pb^{212}) に結合される（例えば、コンジュゲートされる）。一実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、薬物（例えば、代謝拮抗薬、葉酸拮抗薬、アントラサイクリン（例えば、ドキシソルピシン）、メトトレキサート、タキサン（例えば、ドセタキセル）、パクリタキセル、オーリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、またはカリチアマイシン）に結合される（例えば、コンジュゲートされる）。抗体-薬物コンジュゲートを製造する方法は、当技術分野で公知である（そのようなコンジュゲートに使用し得る薬物、および抗体を薬物に連結するために使用し得るリンカーを含む）（例えば、Peters & Brown, 2015, Biosci. Rep. 35, e00225, doi:10.1042/BSR20150089を参照）。

【0134】

また、同じエピトープに結合する抗体もしくはその断片、および/またはヒトNMP1c:HLA-A2への結合について、本明細書に記載されるいずれかの抗体および断片（例えば、それぞれ配列番号5および3によって示されるVHおよびVLアミノ酸配列を含む抗体または抗体断片）と競合する抗体もしくはその断片も、本開示による範囲に含まれる。同じエピトープを認識するか、または結合について競合する抗体およびその断片は、慣行的な手法を使用して同定することができる。そのような手法としては、例えば、1つの抗体が標的抗原に対する別の抗体の結合を阻止する能力を示すイムノアッセイ、すなわち、競合結合アッセイが挙げられる。競合結合は、被験抗体が、共通抗原、例えば、NMP1c:HLA-A2に対する参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定される。数多くの種類の競合結合アッセイが公知であり、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接または間接酵素イムノアッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)を参照); 固相直接ピオチン-アビジンEIA (Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)を参照); 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)を参照); I-125標識を使用する固相直接標識RIA (Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)を参照); 固相直接ピオチン-アビジンEIA (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)); および直接標識RIA (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)) が挙げられる。典型的には、そのようなアッセイは、固体表面に結合させた精製抗原（例えば、NMP1c:HLA-

A 2) またはこれらのいずれかを有する細胞、非標識被験抗体および標識参照抗体（例えば、それぞれ配列番号 5 および 3 によって示される V H および V L アミノ酸配列を含む抗体）の使用を伴う。競合阻害は、被験抗体の存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を測定することによって測定される。通常、被験抗体は過剰に存在する。通常、競合抗体が過剰に存在する場合、それは参照抗体の共通抗原への特異的結合を少なくとも 50 ~ 55 %、55 ~ 60 %、60 ~ 65 %、65 ~ 70 %、70 ~ 75 % またはそれを上回って阻害する。他の手法としては、例えば、エピトープマッピング法、例えば、エピトープの原子分解能を提供する抗原：抗体複合体の結晶の X 線分析が挙げられる。他の方法では、抗原断片または抗原の変異した変形物への抗体の結合をモニターし、抗原配列内のアミノ酸残基の改変に起因する結合の減少がエピトープ構成要素の指標であるとしばしばみ 10
 なされる。加えて、エピトープマッピングのためのコンピュータ計算による組合せ法を使用することもできる。これらの方法は、目的の抗体が、特異的な短いペプチドを、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーからアフィニティー分離する能力に依拠している。次いで、これらのペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義のためのリードとみなされる。エピトープマッピングについては、立体構造的に不連続なエピトープをマッピングすることが示されている計算アルゴリズムも開発されている。

【 0 1 3 5 】

ネオエピトープを同定するための方法

一部の実施形態では、本開示は、M H C 分子と複合体を形成した（またはそれによって 20
 提示される）ネオエピトープを含む抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、ネオエピトープは、腫瘍特異的またはがん特異的ネオエピトープである。一部の実施形態では、M H C 分子は M H C クラス I 分子である。

【 0 1 3 6 】

ネオエピトープの由来となった腫瘍特異抗原またはがん特異抗原は、非サイレント体細胞変異に起因する変化したアミノ酸配列を含有する。例えば、変異由来のネオエピトープは、点変異（例えば、タンパク質中に異なるアミノ酸をもたらす非同義変異）；終止コドンが改変されるかまたは欠失して、C 末端に新規の腫瘍特異的配列を有するより長いタンパク質の翻訳をもたらすリードスルー変異；成熟 m R N A へのイントロンの包含をもたらし、それ故に特有の腫瘍特異的タンパク質配列をもたらすスプライス部位変異；2 つのタンパク質の接合部に腫瘍特異的配列を有するキメラタンパク質を生じさせる染色体再編成（すなわち、遺伝子融合）；新規の腫瘍特異的タンパク質配列を有する新たなオープンリーディングフレームをもたらすフレームシフト変異または欠失；および転座によって生じる。 30

【 0 1 3 7 】

腫瘍特異的またはがん特異的変異に起因する腫瘍ネオエピトープの同定のための方法は、当技術分野で公知である（例えば、Richters, et al. (2019) Genome Medicine 11:56; Liu, et al (2017) Cell 168:600 を参照）。そのような方法としては、一般に、腫瘍特異的変異の同定（例えば、核酸またはタンパク質のディープシーケンシング法の使用）、患者のヒト白血球抗原型の同定および腫瘍に存在する対応する主要組織適合抗原複合体の予測、ネオエピトープの同定（例えば、患者の H L A アレルに結合する可能性があり、腫瘍に存在する変異に基づく候補 T 細胞エピトープのセットを生成させるために、検証されたペプチド - M H C 結合予測アルゴリズムまたは分析手法の適用を使用すること）、任意選択で、選択されたネオエピトープに対する抗原特異的 T 細胞の実証、または候補ネオエピトープが腫瘍表面上の H L A タンパク質に結合していることの実証が挙げられる。 40

【 0 1 3 8 】

ディープ核酸手法は当技術分野で公知である。任意の好適な配列分析法が使用される。そのような方法としては、例えば、チェーンターミネーションシーケンシング法に基づく従来の S a n g e r シーケンシングを使用する配列分析が挙げられる（例えば、San 50

ger, et al (1977) PNAS 74:5463を参照)。さらなる一例として、配列分析の方法として、次世代シーケンシング (NGS) の使用が挙げられる。NGSの方法は当技術分野で公知であり、ピロシーケンス法に基づくシーケンシング技術、合成による Illumina HiSeq and MiSeqシーケンシング、supported oligonucleotide ligation and detection (SOLiD)、DNAナノボールシーケンシング、Ion Torrentシーケンシング、単一分子リアルタイム (SMRT) シーケンシング、Helicosシーケンシング、および Nanoporeシーケンシングが挙げられる。

【0139】

核酸シーケンシングは、全腫瘍ゲノム、腫瘍エキソーム (タンパク質をコードする DNA)、ゲノムの標的化部分 (例えば、HLA遺伝子座) または腫瘍トランスクリプトームに対して行われる。一部の態様では、シーケンシングの結果は、既知の対照セットと、または正常組織もしくは患者の対応する正常組織に対して行われるシーケンシング分析と比較される。1つまたは複数のアルゴリズムを使用して、シーケンシングデータに存在する体細胞変異の異なるクラスを同定する。例えば、一部の実施形態では、アルゴリズムは、単一ヌクレオチドバリエーションによって生じる多様性を検出するため (例えば、Cornish, et al (2015) Biomed Res Int 2015:456479; Ghoneim, et al (2014) BMC Res Notes 7:864; Kroigard, et al (2016) PLoS One 11:e0151664を参照)、および/またはインデルによって生じる多様性を検出するために使用される (例えば、Mose, et al (2014) 30:2813-2815; Narzisi, et al (2014) Nat Methods 11:1033-1036を参照)。さらに、一部の実施形態では、2つのタンパク質コード配列の融合の検出が、RNAシーケンシングデータおよび/または全ゲノムシーケンシングデータの分析によって行われる (例えば、Li, et al (2011) Bioinformatics 27:1708; Scolnick, et al (2015) PLoS One 10:30128916; Zhang, et al (2016) Genome Res 26:108; Kumar, et al (2016) Wiley Interdiscip Rev RNA 7:811を参照)。腫瘍DNAまたはRNAにおけるバリエーションがひとたび検出されると、翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列に対する各バリエーションの影響が、当技術分野で公知のコンピュータ計算ツールを使用して決定される。さらに、翻訳されたポリペプチドにおける切断部位の予測およびMHCクラスI抗原プロセッシングに由来するペプチドの同定を助ける複数のツールが利用可能である。そのようなツールの非限定的な例としては、NetChop 2.0.5、NetChop Cterm、およびProteasMMが挙げられる (例えば、Nielsen, et al (2005) Immunogenetics 57:33; Tenzer, et al (2005) Cell Mol Life Sci 62:1025を参照)。

【0140】

タンパク質シーケンシングの方法も当技術分野で公知である。一部の態様では、トピックシーケンシングが腫瘍プロテオームに対して行われる。一部の態様では、タンパク質量分析を使用して、腫瘍細胞上のMHCタンパク質に結合した変異ペプチドの存在を同定または検証する。ペプチドは、腫瘍細胞から、または腫瘍から免疫沈降されたHLA分子から酸溶出され、次いで質量分析を使用して同定される。

【0141】

一部の態様では、バリエーション腫瘍特異的ペプチドがひとたび同定されると、MHCクラスIまたはII分子へのその結合の予測は、患者のHLAハプロタイプの知識を必要とする。ヒトのMHCは、染色体6p21.3上に位置するHLA遺伝子複合体によってコードされている。この座位は多型性が高く、12,000種を上回るアレルが確定している。HLA遺伝子は個別化しているため、正確なHLAハプロタイプ決定が必要である。HLAハプロタイプ決定の方法は当技術分野で公知である。例えば、HLAハプロタイプ決定は、配列特異的PCR増幅およびSangerシーケンシングまたはNGSに基づく方法を使用するシーケンシングを使用して行われる。シーケンシングデータに基づくHLAクラスIおよびIIハプロタイプの同定には、複数のアルゴリズム、例えば、PolySolver (Shukla, et al (2015) Nat Biotech 33:1152)、HLAMin

10

20

30

40

50

er (Warren, et al (2012) Genome Med 4:95)、および OptiType (Szolek, et al (2014) Bioinformatics 30:3310) が利用可能である。

【0142】

一部の態様では、コンピュータアルゴリズムが、推定されるネオエピトープ、すなわち、ペプチド提示複合体の形でクラス I またはクラス II の MHC 分子による結合を受け、次いでこの形で T リンパ球の T 細胞受容体によって認識されるペプチド配列を予測するために使用される。MHC クラス I に結合するペプチドを同定するために有用なプログラムの非限定的な例としては、SMM (Nielsen, et al (2007) BMC Bioinformatics 8:238)、SMMPMBEC (Kim et al (2009) BMC Bioinformatics 10:394)、Pickpocket (Zhang, et al 2009) Bioinformatics 25:1293)、NetMHC (Andreatta, et al 2016) Bioinformatics 32:511)、NetMHCpan (Jurtz et al (2017) J Immunol 199:3360)、NetMHCcons (Karosiene, et al (2012) Immunogenetics 64:177)、MHCflurry (O'Donnell, et al (2018) Cell Syst 7:129)、および EDGE (Bulik-Sullivan et al (2018) Nat Biotech) が挙げられる。

【0143】

一部の態様では、推定されるネオエピトープがひとたび選択されると、それらが *in vitro* および / または *in vivo* のアッセイを使用してさらに試験される。一部の態様では、選択されたペプチドを合成して、異なる HLA ハプロタイプによってコードされる MHC 分子への結合を決定するために、ヒト HLA パネルにおいてスクリーニングする。

【0144】

抗体を製造する方法

本明細書に記載される抗体および断片は、当技術分野で公知の任意の方法によって作製することができる。

【0145】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、例えば、ファージディスプレイ技術、細菌ディスプレイ、酵母表面ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、および無細胞 (例えば、リボソームディスプレイ) 抗体スクリーニング手法を含むことができる (例えば、Etz et al. (2001) J Bacteriol 183:6924-6935; Cornelis (2000) Curr Opin Biotechnol 11:450-454; Klemm et al. (2000) Microbiology 146:3025-3032; Kieke et al. (1997) Protein Eng 10:1303-1310; Yeung et al. (2002) Biotechnol Prog 18:212-220; Boder et al. (2000) Methods Enzymology 328:430-444; Grabherr et al. (2001) Comb Chem High Throughput Screen 4:185-192; Michael et al. (1995) Gene Ther 2:660-668; Pereboev et al. (2001) J Virol 75:7107-7113; Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods 231:119-135; Chao et al., 2006, Nature Protocols 1(2):755-768; および Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol 18:1287-1292 を参照)。

【0146】

様々なファージディスプレイ法を使用する抗体を同定するための方法が当該技術分野で公知である。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、それをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面上に提示される。そのようなファージを利用して、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (例えば、ヒトまたはマウス) から発現される抗体の抗原結合ドメイン、例えば、Fab、Fv、またはジスルフィド結合安定化 Fv 抗体断片を提示させることができる。これらの方法に使用されるファージは、典型的には、繊維状ファージ、例えば、fd および M13 である。抗原結合ドメインは、ファージコートタンパク質 pIII、pVII、または pIX のいずれかに組換えで融合されたタンパク質として発現される。例えば、Shi et al. (2010) JMB 397:385-396 を参照。本明細書に記載される免疫グロブリン、またはその断片を製造

するために使用し得るファージディスプレイ法の例としては、Brinkman et al. (1995) *J Immunol Methods* 182:41-50; Ames et al. (1995) *J Immunol Methods* 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) *Eur J Immunol* 24:952-958; Persic et al. (1997) *Gene* 187:9-18; Burton et al. (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; ならびに P C T 公開国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号パンフレット、国際公開第 9 1 / 1 0 7 3 7 号パンフレット、国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号パンフレット、国際公開第 9 2 / 1 8 6 1 9 号パンフレット、国際公開第 9 3 / 1 1 2 3 6 号パンフレット、国際公開第 9 5 / 1 5 9 8 2 号パンフレット、および国際公開第 9 5 / 2 0 4 0 1 号パンフレットに開示されているものが挙げられる。好適な方法は、例えば、米国特許第 5, 6 9 8, 4 2 6 号明細書; 同第 5, 2 2 3, 4 0 9 号明細書; 同第 5, 4 0 3, 4 8 4 号明細書; 同第 5, 5 8 0, 7 1 7 号明細書; 同第 5, 4 2 7, 9 0 8 号明細書; 同第 5, 7 5 0, 7 5 3 号明細書; 同第 5, 8 2 1, 0 4 7 号明細書; 同第 5, 5 7 1, 6 9 8 号明細書; 同第 5, 4 2 7, 9 0 8 号明細書; 同第 5, 5 1 6, 6 3 7 号明細書; 同第 5, 7 8 0, 2 2 5 号明細書; 同第 5, 6 5 8, 7 2 7 号明細書; 同第 5, 7 3 3, 7 4 3 号明細書および同 5, 9 6 9, 1 0 8 号明細書にも記載されている。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、ファージディスプレイ抗体ライブラリーは、免疫処置を受けた哺乳動物からの B 細胞から収集した mRNA を使用して生成させることができる。例えば、B 細胞を含む脾臓細胞試料は、上記のような N P M 1 c : H L A - A 2 複合体による免疫処置を受けたマウスから単離することができる。mRNA を細胞から分離して、標準的な分子生物学的手法を使用して cDNA に変換することができる。例えば、Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane (1988), 上記; Benny K. C. Lo (2004), 上記; および Borrebaek (1995), 上記を参照。免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの可変領域をコードする cDNA を使用して、ファージディスプレイライブラリーを構築する。そのようなライブラリーを作製するための方法は、例えば、Merz et al. (1995) *J Neurosci Methods* 62(1-2):213-9; Di Niro et al. (2005) *Biochem J* 388(Pt 3):889-894; および Engberg et al. (1995) *Methods Mol Biol* 51:355-376 に記載されている。

【 0 1 4 8 】

酵母表面ディスプレイ法を使用して抗体を同定するための方法は、当技術分野で周知である。本明細書に記載される抗体および断片を製造するために使用することができる酵母表面ディスプレイ法の一例は、Chao et al., 2006, *Nature Protocols* 1(2):755-768 に記載されている方法を含む。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体を製造する方法は、対象（例えば、非ヒト哺乳動物）に、好適な免疫原による免疫処置を行うステップを含み得る。本明細書に記載される抗体のいずれかを生成させるための好適な免疫原について、本明細書に記載する。例えば、N P M 1 c : H L A - A 2 に結合する抗体を生成させるために、当業者は、好適な対象（例えば、非ヒト哺乳動物、例えば、ラット、マウス、スナネズミ、ハムスター、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ラマ、ウマ、または非ヒト霊長類）に、例えば、N P M 1 c ネオエピトープが A I Q D L C L A V (配列番号 1) である場合に、N P M 1 c : H L A - A 2 複合体を含む抗原による免疫処置を行うことができる。好適な対象（例えば、非ヒト哺乳動物）に、その哺乳動物による抗体の産生を誘発するのに十分な回数の以後の追加免疫処置とともに、好適な抗原により免疫処置を行うことができる。免疫原は、アジュバントとともに対象（例えば、非ヒト哺乳動物）に投与することができる。

【 0 1 5 0 】

ハイブリドーマ技術を使用して抗体を作製する方法は、当技術分野で周知である。一部の実施形態では、本方法は、免疫原に結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリド

ーマ細胞株を調製するステップを含む。例えば、好適な哺乳動物、例えば、実験用マウスに、上記のようなNPM1c:HLA-A2複合体による免疫処置を行う。免疫処置を受けた哺乳動物の抗体産生細胞(例えば、脾臓のB細胞)は、免疫原の少なくとも1回の追加免疫処置の2日後から4日後までに単離することができ、次いで培養下で短時間増殖させた後に、好適な骨髓腫細胞株の細胞との融合を行う。細胞は、例えば、融合促進剤、例えば、ワクシニアウイルスまたはポリエチレングリコールの存在下で融合させることができる。融合で得られたハイブリッド細胞をクローニングして、所望の抗体を分泌する細胞クローンを選択する。例えば、好適な免疫原による免疫処置を受けたBalb/cマウスの脾細胞を、骨髓腫細胞株PAIまたは骨髓腫細胞株Sp2/0-Ag14の細胞と融合させることができる。融合後に、細胞を、正常な骨髓腫細胞が所望のハイブリドーマ細胞を過剰増殖させるのを防ぐために、選択培地、例えば、HAT培地を一定間隔で添加した好適な培地中で増大させる。次いで、得られたハイブリッド細胞を、所望の抗体(例えば、NPM1c:HLA-A2に結合する抗体)の分泌についてスクリーニングする。

10

【0151】

一部の実施形態では、当業者は、例えば、米国特許第6,300,064号明細書(Knappik et al.; Morphosys AGに対する)およびSchoonbroodt et al. (2005) Nucleic Acids Res 33(9):e81に記載されているように、非免疫ベースのライブラリーから目的の抗体を同定することができる。

【0152】

一部の実施形態では、選択とスクリーニングの組合せを使用して、例えば、ハイブリドーマ由来の抗体の集団またはファージディスプレイ抗体ライブラリーから目的の抗体を同定することができる。好適な方法は当技術分野で公知であり、例えば、Hoogenboom (1997) Trends in Biotechnology 15:62-70; Brinkman et al. (1995), 上記; Ames et al. (1995), 上記; Kettleborough et al. (1994), 上記; Persic et al. (1997), 上記; および Burton et al. (1994), 上記に記載されている。例えば、それぞれがバクテリオファージコートタンパク質(例えば、M13ファージのpIII、pVIIIIまたはpIX)と異なる抗原結合領域との融合タンパク質をコードする複数のファージミドベクターを、標準的な分子生物学的手法を使用して作製し、次いで細菌(例えば、大腸菌(E. coli))の集団に導入する。細菌におけるバクテリオファージの発現は、一部の実施形態では、ヘルパーファージの使用を必要とする可能性がある。一部の

20

30

【0153】

実施形態では、ヘルパーファージは必要とされない(例えば、Chasteen et al., (2006) Nucleic Acids Res 34(21):e145を参照)。細菌から産生されたファージを回収し、次いで、例えば、固体支持体に結合した(固定化された)標的抗原と接触させる。また、ファージを溶液中で抗原と接触させてもよく、次いでこの複合体を固体支持体に結合させる。

上記の方法を使用してスクリーニングされた抗体の部分集団を、当技術分野で公知の任意の免疫学または生化学に基づく方法を使用して、特定の抗原(例えば、NPM1c:HLA-A2)に対するそれらの特異性および結合親和性について特徴付けることができる。例えば、NPM1c:HLA-A2に対する抗体の特異的結合を、免疫学または生化学

40

【0154】

50

キメラ抗体を作製するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、Morrison, 1985, *Science* 229:1202-7; Oi and Morrison, 1986, *BioTechniques* 4:214-221; Gillies et al., 1989, *J Immunol. Methods* 125:191-202; および米国特許第 5, 807, 715 号明細書、同第 4, 816, 567 号明細書、同第 4, 816, 397 号明細書および同第 6, 331, 415 号明細書を参照）。

【0155】

ヒト化抗体を作製するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、国際公開公報第 91/09967 号パンフレット; Padlan, 1991, *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka et al, 1994, *Prot Engineering* 7(6): 805-814; Roguska et al, 1994, *PNAS* 91: 969-973; 国際公開第 93/17105 号パンフレット; Tan et al, 2002, *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas et al, 2000, *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea et al, 2000, *Methods* 20(3): 267-79; Baca et al, 1997, *J Biol Chem* 272(16):10678-84; Roguska et al, 1996, *Protein Eng* 9(10): 895-904; Couto et al, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto et al, 1995, *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150(2):409-10; Pedersen et al, 1994, *J Mol Biol* 235(3): 959-73 を参照。例えば、ヒト化抗体は、CDR グラフティングによって作製することができる。

10

【0156】

ヒト抗体を作製するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、ヒト抗体は、上記のように、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用して、ファージディスプレイまたは酵母表面ディスプレイ法によって作製することができる。米国特許第 4, 444, 887 号明細書、同第 4, 716, 111 号明細書および同第 5, 885, 793 号明細書; 国際公開公報第 98/46645 号パンフレット、国際公開公報第 98/50433 号パンフレット、国際公開公報第 98/24893 号パンフレット、国際公開公報第 98/16654 号パンフレット、国際公開公報第 96/34096 号パンフレット、国際公開公報第 96/33735 号パンフレット、および国際公開公報第 91/10741 号パンフレットも参照のこと。また、ヒト抗体を、マウス-ヒトハイブリドーマを使用して製造することもできる (Shinmoto et al, 2004, *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa et al, 2005, *Human Antibodies* 14: 27-31 を参照)。

20

【0157】

抗体断片を製造する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Fab 断片および F(ab')₂ 断片は、ペプシン (F(ab')₂ 断片を生成させるため) またはパパイン (Fab 断片を生成させるため) などの酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク分解切断によって生成させることができる。scFv 断片を製造する方法も当技術分野で公知である (例えば、Ahmad et al., 2012, *Clinical and Developmental Immunology*, doi: 10.1155/2012/980250; Wang et al., 2006, *Anal. Chem.* 78, 997-1004; Pansri et al., 2009, *BMC Biotechnology* 9:6; Chao et al., 2006, *Nature Protocols* 1(2):755-768 を参照)。所望の抗原結合特性を有する scFv を、ファージディスプレイ技術または酵母表面ディスプレイ技術によって選択することができる。scFv は、短いポリペプチドリンカーを介して免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変ドメインを融合させること (組換え発現手法を使用して) によって構築することができる。単ドメイン抗体 (例えば、軽鎖を欠く抗体) を製造する方法は、当技術分野で周知である (例えば、Riechmann & Muyldermans, 1999, *J Immunol* 231:25-38; Nuttall et al, 2000, *Curr Pharm Biotechnol* 1(3):253-263; Muyldermans, 2001, *J Biotechnol* 74(4): 277-302 を参照)。

30

40

【0158】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野で周知である (例えば、Konterman, 2012, *MAbs* 4: 182-197; Gramer et al., 2013, *MAbs* 5:962-973 を参照)。

【0159】

選択された CDR アミノ酸配列が短い配列 (例えば、10 ~ 15 アミノ酸長未満) であ

50

る実施形態では、CDRをコードする核酸を、例えば、Shiraishi et al. (2007) Nucleic Acids Symposium Series 51(1):129-130および米国特許第6,995,259号明細書に記載されたように化学合成することができる。アクセプター抗体をコードする所与の核酸配列について、CDRをコードする核酸配列の領域を、標準的な分子生物学の手法を使用して化学合成された核酸で置き換えることができる。化学合成された核酸の5'および3'末端は、その核酸をドナー抗体の可変領域をコードする核酸へとクローニングする際に使用するための粘着末端制限酵素部位を含むように合成することができる。

【0160】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、その対応する変更されていない定常領域に比して増強または低減されたエフェクター機能を有する（またはエフェクター機能を有しない）変更された重鎖定常領域を含む。本明細書に記載される抗体の定常領域が関与するエフェクター機能は、定常領域またはFc領域の特性を変更することによって調節することができる。変更されたエフェクター機能としては、例えば、以下の活性：抗体依存性細胞傷害（ADCC）、補体依存性細胞傷害（CDC）、アポトーシス、1つまたは複数のFc受容体への結合、および炎症誘発性応答のうちの一つまたは複数における調節が挙げられる。調節は、変更されていない形態の定常領域の活性と比較して、変更された定常領域を含有する対象抗体によって示されるエフェクター機能活性の増加、減少、または消失を指す。変更されたFcR結合親和性および/またはADCC活性および/または変更されたCDC活性を有する変更された定常領域は、変更されていない形態の定常領域と比較して、増強または低減されたFcR結合活性および/またはADCC活性および/またはCDC活性のいずれかを有するポリペプチドである。FcRへの結合増加を示す変更された定常領域は、少なくとも一つのFcRに、変更されていないポリペプチドよりも高い親和性で結合する。FcRへの結合の減少を示す変更された定常領域は、変更されていない形態の定常領域よりも低い親和性で、少なくとも一つのFcRに結合する。

【0161】

抗体にCDC活性またはADCC活性を付与する方法は、当技術分野で周知である（例えば、Kellner et al., 2014, Methods 65: 105-113;国際公開第2012010562号パンフレット; Natsume et al., 2009, Drug Design, Development and Therapy 3(3):7-16を参照）。そのような方法には、Fcアイソタイプシャッフリング、増強されたCDCおよび/またはADCC活性を付与するFc領域におけるアミノ酸変異、ならびに増強されたCDCおよび/またはADCC活性を付与するFc領域グリコシル化プロファイルの変化が含まれるが、これらに限定されない。

【0162】

例えば、本明細書に記載される抗体は、増強または低減された補体依存性細胞傷害（CDC）を示す変更された定常領域を含有してもよい。調節されたCDC活性は、抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、または欠失を導入することによって達成することができる。例えば、米国特許第6,194,551号明細書を参照。代替的または追加的に、システイン残基をFc領域に導入し、それによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にすることもできる。そのようにして生成されたホモ二量体抗体は、インターナリゼーション能力が改善もしくは低減しているか、および/または補体媒介性細胞殺滅が増加または減少している可能性がある。例えば、Caron et al. (1992) J Exp Med 176:1191-1195およびShopes (1992) Immunol 148:2918-2922; PCT公開国際公開第99/51642号パンフレットおよび国際公開第94/29351号パンフレット; Duncan and Winter (1988) Nature 322:738-40;および米国特許第5,648,260号明細書および同第5,624,821号明細書を参照。

【0163】

本明細書に記載される抗体のいずれかを、当技術分野で公知の任意の免疫学または生化学に基づく方法を使用して、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで、抗原、例えば、NPM1c:HLA-A2に起因する活性または機能のいずれかを調節するそ

の能力について、スクリーニングおよび/または試験することができる。

【0164】

本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、分子生物学およびタンパク質化学の技術分野で公知の種々の手法を使用して作製することができる。例えば、抗体の重鎖および軽鎖ポリペプチドの一方または両方をコードする核酸を、例えば、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および転写停止配列、翻訳開始配列および翻訳停止配列、転写ターミネーターシグナル、ポリアデニル化シグナル、ならびにエンハンサー配列またはアクチベーター配列を含む、転写調節配列および翻訳調節配列を含有する発現ベクターに挿入することができる。調節配列には、プロモーター、ならびに転写開始配列および転写停止配列が含まれる。加えて、発現ベクターは、それが2つの異なる生物にお

10

【0165】

哺乳動物細胞における核酸からの、クローニングされた重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現のために、いくつかの可能性のあるベクター系を利用することができる。ベクターの1つのクラスは、所望の遺伝子配列の宿主細胞ゲノムへの組込みに依拠する。安定に組み込まれたDNAを有する細胞は、薬剤耐性遺伝子、例えば、大腸菌 (*E. coli*) gpt (Mulligan and Berg (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:2072) または Tn5neo (Southern and Berg (1982) Mol Appl Genet 1:327) を、同時に導入することによって選択することができる。選択マーカー遺伝子は、発現させようとするDNA遺伝子配列に連結させてもよく、またはコトランスフェクションによって同じ細胞に導入することもできる (Wigler et al. (1979) Cell 16:77)。ベクターの第2のクラスは、染色体外プラスミドに自己複製能を付与するDNAエレメントを利用する。これらのベクターは、動物ウイルス、例えば、ウシパピローマウイルス (Sarver et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79:7147)、サイトメガロウイルス、ポリオーマウイルス (Deans et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:1292)、またはSV40ウイルス (Lusky and Botchan (1981) Nature 293:79) に由来し得る。

20

【0166】

発現ベクターは、核酸のその後の発現のために好適な様式で、細胞に導入することができる。導入の方法は、以下に述べるように、標的となる細胞の型によって主に決まる。例示的な方法には、CaPO4沈殿、リボソーム融合、カチオン性リボソーム、エレクトロポレーション、ウイルス感染、デキストラン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、および直接マイクロインジェクションが含まれる。

30

【0167】

抗体またはその抗原結合断片の発現のための適切な宿主細胞には、酵母、細菌、昆虫、植物、および哺乳動物細胞が含まれる。特に関心が持たれるのは、大腸菌 (*E. coli*) などの細菌、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの真菌、SF9などの昆虫細胞、哺乳動物細胞株 (例えば、ヒト細胞株)、ならびに初代細胞株である。

40

【0168】

一部の実施形態では、抗体またはその断片を、トランスジェニック動物 (例えば、トランスジェニック哺乳動物) において発現させ、そこから精製することができる。例えば、抗体を、Houdebine (2002) Curr Opin Biotechnol 13(6):625-629; van Kuik - Romeijn et al. (2000) Transgenic Res 9(2):155-159; および Pollock et al. (1999) J Immunol Methods 231(1-2):147-157に記載されているように、トランスジェニック非ヒト哺乳動物 (例えば、齧歯類) において産生させ、例えば、乳から単離

50

することができる。

【0169】

抗体およびその断片は、抗体または断片をコードする核酸を含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を、タンパク質の発現を可能にするのに十分な条件下で、ある長さの時間をかけて培養することによって、細胞から産生させることができる。タンパク質発現のためのそのような条件は、発現ベクターおよび宿主細胞の選択によって異なると考えられ、慣行的な実験を通して当業者によって容易に確認されるであろう。例えば、大腸菌 (*E. coli*) で発現された抗体を、封入体からリフォールディングさせることができる (Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30を参照)。細菌発現系およびそれらの使用のための方法は、当技術分野で周知である (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, and Molecular Cloning--A Laboratory Manual --3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)を参照)。コドン、好適な発現ベクターおよび好適な宿主細胞の選択は、いくつかの要因に応じて異なり、必要に応じて容易に最適化され得る。本明細書に記載される抗体 (またはその断片) は、哺乳動物細胞において、または酵母、バキュロウイルス、および *in vitro* 発現系を含むがこれらに限定されない、他の発現系において発現させることができる (例えば、Kasubaska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220を参照)。

10

【0170】

発現の後に、抗体およびその断片を単離することができる。抗体またはその断片は、試料中にどのような他の構成成分が存在するかに応じて、当業者に公知の種々の方法で単離または精製することができる。標準的な精製方法には、電気泳動的、分子的、免疫学的な手法、ならびにイオン交換、疎水性、アフィニティー、および逆相 HPLC クロマトグラフィーを含む、クロマトグラフィー手法が含まれる。例えば、抗体は、標準的な抗体カラム (例えば、プロテイン A または プロテイン G カラム) を使用して精製することができる。タンパク質濃縮と組み合わせた、限外濾過およびダイアフィルトレーションの手法も有用である。例えば、Scopes (1994) "Protein Purification, 3rd edition," Springer-Verlag, New York City, New York を参照。必要な精製の度合いは、所望の用途によって異なると考えられる。一部の例では、発現された抗体またはその断片の精製は必要ではない。

20

30

【0171】

精製された抗体またはその断片の収量または純度を決定するための方法は当技術分野で公知であり、例えば、Bradford アッセイ、UV 分光法、Biuret タンパク質アッセイ、Lowry タンパク質アッセイ、アミドブラックタンパク質アッセイ、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、質量分析 (MS) 法、およびゲル電気泳動法 (例えば、タンパク質染色、例えば、クーマシーブルーまたはコロイド銀染色を使用する) が含まれる。

【0172】

抗体またはその抗原結合断片は、その発現および精製の後に改変することができる。改変は、共有結合性または非共有結合性の改変であり得る。そのような改変は、例えば、ポリペプチドの標的アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、抗体または断片に導入することができる。改変のための好適な部位は、例えば、抗体または断片の構造分析またはアミノ酸配列分析を含む、種々の基準のいずれかを使用して選択することができる。

40

【0173】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、異種部分にコンジュゲートさせることができる。異種部分は、例えば、異種ポリペプチド、治療薬もしくは細胞傷害性薬剤 (例えば、毒素または薬物)、または検出可能な標識、例えば、限定はされないが、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、重金属標識、発光標識、またはビオチンもしくはストレプトアビジンなどのアフィニティータグであり得る。好適な異種ポリペプチドには、例え

50

ば、抗体または断片の精製に使用するための、抗原タグ（例えば、FLAG（DYKDDDDK（配列番号44））、ポリヒスチジン（6-His；HHHHHH（配列番号45））、ヘマグルチニン（HA；YPYDVPDYA（配列番号46））、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、またはマルトース結合タンパク（MBP））が含まれる。異種ポリペプチドにはまた、診断マーカーまたは検出マーカーとして有用であるポリペプチド（例えば、酵素）、例えば、ルシフェラーゼ、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP））、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）も含まれる。好適な放射性標識には、例えば、³²P、³³P、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、および³Hが含まれる。好適な蛍光標識には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、Dy Light（商標）488、フィコエリトリン（PE）、ヨウ化プロピジウム（PI）、PerCP、PE-Alexa Fluor（登録商標）700、Cy5、アロフィコシアニン、およびCy7が含まれるが、これらに限定されない。発光標識には、例えば、種々の発光ランタニド（例えば、ユーロピウムまたはテルビウム）キレートの内いずれかが含まれる。例えば、好適なユーロピウムキレートには、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはテトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）のユーロピウムキレートが含まれる。酵素標識には、例えば、アルカリホスファターゼ、CAT、ルシフェラーゼ、および西洋ワサビペルオキシダーゼが含まれる。

10

【0174】

2つのタンパク質（例えば、抗体および異種部分）は、いくつかの公知の化学架橋剤の内いずれかを使用して架橋することができる。そのような架橋剤の例は、「妨害された」ジスルフィド結合を含む連結を介して2つのアミノ酸残基を連結するものである。これらの連結において、架橋単位内のジスルフィド結合は、例えば、還元型グルタチオンまたは酵素ジスルフィド還元酵素の作用による還元から、（ジスルフィド結合の両側の妨害基によって）保護される。1つの好適な試薬である4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-（2-ピリジルジチオ）トルエン（SMP T）は、一方のタンパク質の末端リシンおよび他方のものの末端システインを利用して、2つのタンパク質間にそのような連結を形成する。各タンパク質上の異なるカップリング部分によって架橋するヘテロ二官能性試薬を使用することもできる。他の有用な架橋剤には、2つのアミノ基を連結する試薬（例えば、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド）、2つのスルフヒドリル基を連結する試薬（例えば、1,4-ビス-マレイミドブタン）、アミノ基とスルフヒドリル基とを連結する試薬（例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、アミノ基とカルボキシル基とを連結する試薬（例えば、4-[p-アジドサリチルアミド]ブチルアミン）、およびアミノ基とアルギニンの側鎖に存在するグアニジニウム基とを連結する試薬（例えば、p-アジドフェニルグリオキサール-水和物）が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0175】

一部の実施形態では、放射性標識を、抗体のアミノ酸骨格に直接コンジュゲートさせることができる。あるいは、放射性標識を、遊離アミノ基に結合して関連タンパク質のメタヨードフェニル（mIP）誘導体を形成するより大きな分子（例えば、メタ-[¹²⁵I]ヨードフェニル-N-ヒドロキシスクシンイミド（[¹²⁵I]mIPNH₂中の¹²⁵I）（例えば、Rogers et al. (1997) J Nucl Med 38:1221-1229を参照）またはキレート剤（例えば、DOTAまたはDTPA）の一部として含めて、次いでそれをタンパク質骨格に結合させてもよい。放射性標識またはそれを含有するより大きな分子/キレート剤を、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片にコンジュゲートさせる方法は、当技術分野で公知である。そのような方法は、タンパク質への放射性標識またはキレート剤の結合を助長する条件（例えば、pH、塩濃度、および/または温度）下で、タンパク質を放射性標識とインキュベートすることを伴う（例えば、米国特許第6,001,329号明細書を参照）。

40

【0176】

50

蛍光標識（「フルオロフォア」と称される場合もある）を、タンパク質（例えば、抗体）にコンジュゲートさせる方法は、タンパク質化学の技術分野で公知である。例えば、フルオロフォアを、フルオロフォアに結び付いたスクシンイミジル（NHS）エステルまたはテトラフルオロフェニル（TFP）エステル部分を使用して、タンパク質の遊離アミノ基（例えば、リシンの）またはスルフヒドリル基（例えば、システインの）にコンジュゲートさせることができる。一部の実施形態では、フルオロフォアを、スルホ-SMCCなどのヘテロ二官能性架橋剤部分にコンジュゲートさせることができる。好適なコンジュゲーション法は、抗体タンパク質、またはその断片を、フルオロフォアのタンパク質への結合を助長する条件下でフルオロフォアとインキュベートすることを伴う。例えば、Welch and Redvanly (2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications," John Wiley and Sons (ISBN 0471495603)を参照。

【0177】

一部の実施形態では、抗体または断片を、例えば、循環中、例えば、血液、血清、または他の組織中での抗体の安定化および/または保持を改善する部分によって変更することができる。例えば、抗体または断片を、例えば、Lee et al. (1999) *Bioconjug Chem* 10(6): 973-8; Kinstler et al. (2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485; および Roberts et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476に記載されているようにPEG化すること、またはHES化することができる（Fresenius Kabi, Germany; 例えば、Paviscic et al. (2010) *Int J Pharm* 387(1-2):110-119を参照）。安定化部分は、抗体（または断片）の安定性または保持を、少なくとも約1.5倍（例えば、少なくとも約2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、もしくは50倍またはそれ以上）に改善し得る。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片を、グリコシル化することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片を、抗体または断片のグリコシル化が減少しているかまたは存在しないように、酵素的もしくは化学的な処理に供するか、または細胞から産生させることができる。グリコシル化が減少した抗体を作製するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第6,933,368号明細書; Wright et al. (1991) *EMBO J* 10(10):2717-2723; and Co et al. (1993) *Mol Immunol* 30:1361に記載されている。

【0179】

二重特異性分子

ある特定の実施形態では、二重特異性分子を形成するために使用し得る抗原結合性構築物が、本明細書において提供される。MHCタンパク質（例えば、抗NPM1c:MHCクラスI抗体）と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に対する抗体、またはその抗原結合断片を、誘導體化するか、または別の分子、例えば、別のペプチドもしくはタンパク質（例えば、別の抗体または受容体のリガンド）に連結させて、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成することができる。例えば、抗NPM1c:HLA-A2抗体、またはその抗原結合断片（例えば、scFv）を、T細胞上（例えば、CD3）またはナチュラルキラー細胞上に発現される抗原に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合断片（例えば、scFv）に連結させることができる。2種を上回る異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子を、誘導體化すること、または本明細書に記載されるような抗体、もしくはその抗原結合断片を複数の他の分子に連結させることによって作り出すこともでき; そのような多重特異性分子も、本明細書で使用される「二重特異性分子」という用語の範囲に含まれることを意図している。本明細書に記載される二重特異性分子を生成させるためには、本明細書に記載されるような抗体、またはその抗原結合断片を、二重特異性分子が生じるように、1つまたは複数の他の分子、例えば、別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣体に連結させるとよい（例えば、化学的カップリングまたはコンジュゲーション、遺伝子融合、非共有結合性会合などによって）。

【0180】

したがって、ある特定の実施形態では、MHCタンパク質（例えば、NPM1c:HLA-A2）と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に対する少なくとも1つの第1の結合特異性（すなわち、二重特異性分子の第1の抗原結合ドメイン）および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性（すなわち、二重特異性分子の第2の抗原結合ドメイン）を含む二重特異性分子が、本明細書において提供される。本明細書に記載される二重特異性分子が多重特異性である実施形態では、分子は第3の結合特異性をさらに含むことができる。

【0181】

ある特定の実施形態では、二重特異性分子の第1の抗原結合ドメインと二重特異性分子の第2の抗原結合ドメインの特異性は同じである。ある特定の実施形態では、二重特異性分子の第1の抗原結合ドメインと二重特異性分子の第2の抗原結合ドメインの特異性は異なる。

10

【0182】

一実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子としては、少なくとも1つの抗体、またはその抗体断片、例えば、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fv断片、もしくは単鎖Fv(scFv)、または単鎖抗体分子が挙げられる。また、その内容が全体にわたって参照により本明細書に組み込まれる、Ladner et al. 米国特許第4,946,778号明細書に記載されているように、抗体が、軽鎖二量体もしくは重鎖二量体、またはその任意のごく小さい断片、例えば、Fvもしくは単鎖構築物であってよい。

20

【0183】

ある特定の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、二重特異性単鎖抗体である。一実施形態では、本開示の二重特異性分子における抗原結合ドメインのうち少なくとも1つは、抗体の可変領域の単鎖断片である。

【0184】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子中に使用される抗体または抗原結合断片は、ヒト性（例えば、ヒトモノクローナル抗体）である。本明細書に記載される二重特異性分子中に使用し得る他の抗体は、マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体（例えば、マウス、キメラまたはヒト化モノクローナル抗体）である。

30

【0185】

本明細書に記載される二重特異性分子は、構成要素である抗原結合ドメインを、当技術分野で公知の方法を使用してコンジュゲートすることによって調製することができる。例えば、二重特異性分子の各抗原結合ドメインを別々に生成させて、次いで互いにコンジュゲートさせることができる。

【0186】

抗原結合ドメインがタンパク質またはペプチドである場合、種々のカップリング剤または架橋剤を、共有結合性コンジュゲーションのために使用することができる。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネート(SPDP)、およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸エステル(スルホ-SMCC)が挙げられる（例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照）。他の方法には、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83)、およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375に記載されているものが含まれる。好ましいコンジュゲーション剤は、SATAおよびスルホ-SMCCであり、いずれもPierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手可能である。

40

50

【0187】

抗原結合特異性が抗体である場合、それらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートさせることができる。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、コンジュゲーションの前に、奇数個の、好ましくは1個のスルフヒドリル残基を含有するように改変される。

【0188】

あるいは、両方の抗原結合ドメインを同一のベクターによってコードさせ、同一の宿主細胞内で発現させて集合させてもよい。この方法は、二重特異性分子が、mAbおよびmAb、mAbおよびFab、mAbおよびFab'、mAbおよびF(ab')₂、mAbおよびFv、mAbおよびscFv、FabおよびF(ab')₂、FabおよびFab'、Fab'およびFab'、F(ab)₂およびF(ab')₂、scFvおよびscFv、FvおよびFv、またはリガンドおよびFab融合タンパク質を含む場合に、特に有用である。二重特異性抗体は、各重鎖のC末端にscFvを含む抗体を含んでもよい。本明細書に記載される二重特異性分子は、1つの単鎖抗体および1つの結合決定基を含む単鎖分子、または2つの結合決定基を含む単鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性抗体は、各重鎖のN末端にscFvを含む抗体を含んでもよい。二重特異性抗体は、各軽鎖のN末端またはC末端にscFvを含む抗体を含んでもよい。二重特異性分子は、少なくとも2つの単鎖分子を含んでもよい。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5,260,203号明細書；米国特許第5,455,030号明細書；米国特許第4,881,175号明細書；米国特許第5,132,405号明細書；米国特許第5,091,513号明細書；米国特許第5,476,786号明細書；米国特許第5,013,653号明細書；米国特許第5,258,498号明細書；および米国特許第5,482,858号明細書に記載されている。

【0189】

二重特異性分子とその特異的標的との結合は、当技術分野で認知された方法、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS分析、バイオアッセイ(例えば、増殖阻害)、またはウエスタンブロットアッセイを使用して確認することができる。これらのアッセイはそれぞれ一般に、目的の複合体に対して特異的である標識試薬(例えば、抗体)を使用することによって、目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。

【0190】

一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、MHCクラスIタンパク質(例えば、HLA-A2)と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原に結合し(例えば、特異的に結合し)、同時に、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞(例えば、CD3)またはナチュラルキラー細胞(例えば、NKp46またはCD16A)上の1つまたは複数の抗原にも結合する(例えば、特異的に結合する)。一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、NPM1c:HLA-A2に特異的に結合し、同時に、免疫エフェクター細胞上の1つまたは複数の抗原にも特異的に結合する。一部の態様では、そのような結合は、免疫エフェクター細胞の腫瘍細胞への再標的化を可能にする(例えば、Chames et al., 2009, MAbs 1:539-547を参照)。免疫エフェクター細胞としては、T細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞およびBリンパ球が挙げられるが、これらに限定されない。一部の態様では、本明細書に記載される二重特異性抗体によって標的化される免疫エフェクター細胞は、T細胞(例えば、CD3)、ナチュラルキラー細胞(例えば、NKp46またはCD16A)、またはマクロファージである。一部の実施形態では、二重特異性分子は、NPM1c:HLA-A2に結合する抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)、および免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞(例えば、CD3)、ナチュラルキラー細胞(例えば、NKp46またはCD16A)、またはマクロファージ上の抗原に結合する抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)を含む。

【0191】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープ（例えば、NPM1cネオエピトープ）を含む抗原に結合し（例えば、特異的に結合し）、同時に、以下の抗原：CD3、NKp46、CD16A、CD40、CD47、4-1BB、TGF-、LAG-3、PD-1、TIM-3、CTLA-4、OX-40、NKp30、NKG2A、NKG2DまたはDNAM-1のうちの1つまたは複数にも結合する（例えば、特異的に結合する）。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CD3に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、NKp46に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CD16Aに対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CD40に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CD47に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、4-1BBに対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、TGF-に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、LAG-3に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、PD-1に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、TIM-3に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CTLA-4に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、OX-40に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、NKp30に対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、NKG2Aに対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、NKG2Dに対する第2の結合特異性を含む。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、DNAM-1に対する第2の結合特異性を含む。

10

20

30

40

50

【0192】

一部の実施形態では、二重特異性分子は、二重特異性単鎖抗体であってもよい。「二重特異性単鎖抗体」または「単鎖二重特異性抗体」という用語は、完全な免疫グロブリンに存在する定常部分および/またはFc部分を欠く、単一のポリペプチド鎖中で少なくとも2つの抗体可変領域を接続することから生じる抗体構築物を指す。例えば、二重特異性単鎖抗体の各抗原特異的部分は、抗体V_H領域および抗体V_L領域を含む。

【0193】

二重特異性単鎖抗体の有利なバリエーションを、以下にN末端からC末端まで記載する（「CD3」は、第2の特異性の一例として使用されるが、別の抗原、例えば、NKp46、CD16A、CD40、CD47、4-1BB、TGF-、LAG-3、PD-1、TIM-3、CTLA-4、OX-40、NKp30、NKG2A、NKG2DまたはDNAM-1によって置換され得る）：

V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_H(CD3)-V_L(CD3)、

V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(CD3)-V_L(CD3)、

V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(CD3)-V_H(CD3)、

V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_L(CD3)-V_H(CD3)、

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)、

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)、

V_L(CD3)-V_H(CD3)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)、または

$V_L(CD3) - V_H(CD3) - V_L(NPM1c : HLA - A2) - V_H(NPM1c : HLA - A2)$ 。

【0194】

本開示の二重特異性分子の抗原結合ドメインは、好ましくは、例えば、それらの由来となった抗体または免疫グロブリン鎖の結合特異性と少なくとも実質的に同一な特異性を有する。

【0195】

ある特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞（例えば、CD3）またはナチュラルキラー細胞（例えば、NKp46またはCD16A）上の1つまたは複数の抗原に結合する二重特異性分子の抗原結合ドメインは、抗原に対して、少なくとも $10^{-4} M$ 、少なくとも $10^{-5} M$ 、少なくとも $10^{-6} M$ 、または少なくとも $10^{-7} M$ 結合親和性（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞（例えば、CD3）またはナチュラルキラー細胞（例えば、NKp46またはCD16A）上の1つまたは複数の抗原に結合する抗原結合ドメインは、抗原に対して、 $10^{-7} M$ よりも強くない（例えば、 $10^{-4} M$ と $10^{-7} M$ の間、または $10^{-5} M$ と $10^{-7} M$ の間）結合親和性（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態では、NPM1c : HLA - A2 抗原に結合する二重特異性分子の抗原結合ドメインは、NPM1c : HLA - A2 抗原に対して、少なくとも $10^{-7} M$ またはより強い、少なくとも $10^{-8} M$ またはより強い、少なくとも $10^{-9} M$ またはより強い、少なくとも $500 nM$ またはより強い、少なくとも $250 nM$ またはより強い、少なくとも $100 nM$ またはより強い、少なくとも $50 nM$ またはより強い、少なくとも $25 nM$ またはより強い、少なくとも $20 nM$ またはより強い、少なくとも $15 nM$ またはより強い、または少なくとも $10 nM$ またはより強い結合親和性（ K_d ）を有する。特定の実施形態では、NPM1c : HLA - A2 抗原に結合する二重特異性分子の抗原結合ドメインは、NPM1c : HLA - A2 抗原に対して、少なくとも $20 nM$ またはより強い、少なくとも $15 nM$ またはより強い、または少なくとも $10 nM$ またはより強い結合親和性（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態では、NPM1c : HLA - A2 抗原に結合する二重特異性分子の抗原結合ドメインは、NPM1c : HLA - A2 抗原に対して、 $0.1 nM$ と $500 nM$ 、 $0.1 nM$ と $100 nM$ 、 $0.5 nM$ と $100 nM$ 、 $0.1 nM$ と $50 nM$ 、 $0.5 nM$ と $50 nM$ 、 $0.1 nM$ と $25 nM$ 、 $0.5 nM$ と $25 nM$ 、 $0.1 nM$ と $15 nM$ 、 $0.5 nM$ と $15 nM$ 、 $0.1 nM$ と $10 nM$ 、もしくは $0.5 nM$ と $10 nM$ の間（または前の値から後の値まで）、または $1 nM$ から $100 nM$ （またはその間の任意の値）の結合親和性（ K_d ）を有する。そのような抗原結合ドメインは、免疫エフェクター細胞上の抗原（例えば、CD3 抗原）に対して、少なくとも $10^{-5} M$ の、例えば、 $10^{-7} M$ よりも強くない結合親和性を有することができ、NPM1c : HLA - A2 抗原に対して、例えば、 $10^{-8} M$ またはより強い、 $50 nM$ またはより強い、 $25 nM$ またはより強い、 $15 nM$ またはより強い、 $10 nM$ またはより強い結合親和性を有することができる。本開示の二重特異性分子のある特定の実施形態では、(a) 第1の抗原結合ドメインの前記結合部位（NPM1c : MHCクラスIに結合する）は、少なくとも約 $10^{-7} M$ 、少なくとも約 $10^{-8} M$ 、少なくとも約 $10^{-9} M$ 、少なくとも約 $500 nM$ 、少なくとも約 $100 nM$ 、少なくとも約 $50 nM$ 、もしくは少なくとも約 $25 nM$ 、もしくは少なくとも約 $15 nM$ の親和性を有し；および/または (b) 第2の抗原結合ドメインの前記結合部位は、約 $10^{-7} M$ よりも弱い、約 $10^{-6} M$ よりも弱い、もしくは $10^{-5} M$ のオーダーの親和性を有する。本開示の二重特異性分子の一部の実施形態では、(a) 第1の抗原結合ドメインの前記結合部位（NPM1c : HLA - A2に結合する）は、少なくとも約 $100 nM$ もしくは少なくとも約 $25 nM$ の親和性を有し；および/または (b) 第2の抗原結合ドメインの前記結合部位は、約 $10^{-7} M$ よりも弱い、約 $10^{-6} M$ よりも弱い、または $10^{-5} M$ のオーダーの親和性を有する。

【0196】

上記で言及したある特定の実施形態によれば、MHCタンパク質（例えば、NPM1c

：H L A - A 2 抗原)と複合体を形成した変異型 N P M 1 c ネオエピトープを含む抗原を認識する結合部位が、破壊しようとする標的細胞を高い効率で捕捉するためには、高い親和性を有することが有利である。一方、免疫エフェクター細胞上の抗原(例えば、C D 3 抗原)を認識する結合部位の結合親和性は、抗原に対する天然受容体(例えば、C D 3 受容体)の結合親和性、または免疫エフェクター細胞受容体(例えば、T 細胞受容体)とそのリガンド、すなわち標的細胞表面上の M H C - ペプチド複合体との相互作用について通常見出される結合親和性のオーダーであり得る。

【0197】

本開示の一実施形態では、本開示の二重特異性分子の前記第1および/または第2のドメインは、天然抗体由来のV_H領域およびV_L領域を模倣するか、またはそれらに対応する。本開示の二重特異性分子に関する結合部位を与える抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、合成抗体、抗体断片、例えば、F a b、F vもしくはs c F v断片など、またはこれらのいずれかの化学的に改変された誘導体であり得る。モノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 495, and Galfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3 によって最初に記載された手法によって調製することができ、これはマウス骨髄腫細胞を、当技術分野によって開発された改変を伴う免疫処置を受けた哺乳動物に由来する脾細胞と融合させることを含む。さらに、前述の抗原に対する抗体またはその断片を、例えば、Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載されている方法を使用することによって得ることもできる。抗体は、ヒトを含むいくつかの種から得ることができる。前記抗体の誘導体がファージディスプレイ手法によって得られる場合には、B I A c o r e システムで使用される表面プラズモン共鳴を使用して、N P M 1 c : H L A - A 2 または第2の抗原に結合するファージ抗体の効率を高めることができる(Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。キメラ抗体の作製は、例えば、国際公開第89/09622号パンフレットに記載されている。ヒト化抗体の作製のための方法は、例えば、欧州特許出願公開第10239400号明細書および国際公開第90/07861号パンフレットに記載されている。本開示に従って利用される抗体のさらなる供給源は、いわゆる異種抗体である。異種抗体、例えば、マウスにおけるヒト抗体の産生に関する一般原理は、例えば、国際公開第91/10741号パンフレット、国際公開第94/02602号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレットに記載されている。本開示に従って利用される抗体の別の供給源は、例えば、Chao et al., 2006, Nature Protocols 1(2):755-768に記載されているように、酵母表面ディスプレイを使用して単離され、操作されたヒト抗体である。

【0198】

一実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子のN P M 1 c : H L A - A 2 特異的ドメインは、配列番号11(A R L G Y P T T T L L P F D Y)として示されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれである少なくとも1つのV_H C D R 3、配列番号10(I S G S G G S T)として示されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれである少なくとも1つのV_H C D R 2、および/または配列番号9(G F T F S S Y A)として示されるアミノ酸配列を含むかまたはそれである少なくとも1つのV_H C D R 1を含む。

【0199】

本開示の二重特異性分子は、N P M 1 c : H L A - A 2 特異的ドメインの1つまたは複数のV_L領域C D Rも含んでもよい。N P M 1 c : H L A - A 2 特異的ドメインのそのようなV_L領域C D Rは、配列番号8(Q Q S Y S T P L T)として示されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれである少なくとも1つのV_L C D R 3、配列番号7(A A S)のアミノ酸配列を含むかもしくはそれである少なくとも1つのV_L C D R 2、および/または配列番号6(Q S I S S Y)として示されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれである少なくとも1つのV_L C D R 1を含む。

【0200】

一実施形態では、二重特異性分子は、1つの構築物（例えば、本明細書に記載されるCDR）においてNPM1c:HLA-A2に特異的に結合する抗体のV_Hおよび/またはV_LのCDR1、CDR2およびCDR3を含む。

【0201】

一実施形態では、本明細書で言及される抗NPM1c:HLA-A2 CDRは、IMGT番号付けシステムに従う。IMGT番号付けスキームは、抗体における残基の一貫した様式での番号付けのために広く採用されている基準である（IMGT（登録商標）、international Immunogenetics information system（登録商標）のウェブサイトimgt.org, founder and director: Marie -Paule Lefranc, Montpellier, Franceを参照；例えば、Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136およびLefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212を参照。これらは両方ともその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0202】

ある特定の実施形態では、本開示の二重特異性分子（例えば、二重特異性抗体または断片）は、NPM1c:HLA-A2およびCD3に同時に結合する。一部の実施形態では、二重特異性分子は、NPM1c:HLA-A2に結合する単鎖可変（scFv）断片、およびCD3に結合する抗体またはその抗原結合断片（例えば、scFv）を含む。

【0203】

本明細書で使用される場合、「ヒトCD3」は、多分子T細胞受容体複合体の一部としてヒトT細胞上に発現される抗原を表し、CD3は、5つの異なる鎖：CD3-、CD3-、CD3-、CD3- およびCD3- からなる。

【0204】

例えば、抗CD3抗体によるT細胞上のCD3のクラスター化により、抗原の結合に類似するが、T細胞サブセットのクローン特異性に非依存的なT細胞の活性化がもたらされる。したがって、その抗原結合ドメインのうちの一つでヒトCD3に特異的に結合する二重特異性分子は、ヒトT細胞上に発現されるヒトCD3複合体に結合することができ、標的細胞の除去/溶解を誘導することができ、そのような標的細胞は、二重特異性分子の他方の非CD3結合部分が結合する抗原（例えば、NPM1c:HLA-A2）を保有/提示している。CD3特異的結合剤（例えば、本明細書に開示される二重特異性分子）によるCD3複合体の結合は、当技術分野で公知のT細胞の活性化をもたらす；例えば、国際公開第99/54440号パンフレットまたは国際公開第2004/106381号パンフレットを参照。一実施形態では、本開示の二重特異性分子は、有利なことに、in vivoおよび/またはin vitroで標的細胞を除去/溶解することができる。対応する標的細胞は、その表面上に腫瘍抗原、例えば、二重特異性分子（すなわち、二重特異性分子の非CD3結合部分）の別の抗原結合ドメインによって認識されるNPM1c:HLA-A2を発現するかまたは提示する細胞であり得る。一実施形態では、さらなる特異性は、NPM1c:HLA-A2に対するものである。

【0205】

本開示の一実施形態では、二重特異性分子のCD3特異的ドメインのV_H領域およびV_L領域は、OKT-3、X35-3、VIT3、BMA030（BW264/56）、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT31、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW24B6、OKT3D、M-T301、SMC2およびF101.01からなる群から選択されるCD3特異的抗体に由来する。これらの抗体のそれぞれは、当技術分野で十分に記載されている（例えば、米国特許第8007796号明細書および米国特許第884088号明細書を参照）。

【0206】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子のCD3特異的ドメインは、配列番号50 (Y Y D D H Y C L D Y)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR3、配列番号49 (Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR2、および/または配列番号47 (G Y T F T R Y T M H)もしくは配列番号48 (R Y T M H)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR1を含む。

【0207】

一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、CD3特異的ドメインの1つまたは複数のV_L領域CDRを含む。CD3特異的ドメインのそのようなV_L領域CDRは、配列番号53 (Q Q W S S N P L T)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_L CDR3、配列番号52 (D T S K V A S)のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_L CDR2、および/または配列番号51 (R A S S S V S Y M N)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_L CDR1を含む。

10

【0208】

一実施形態では、二重特異性分子は、1つの構築物(例えば、本明細書に記載されるCDR)においてCD3に特異的に結合する抗体のV_Hおよび/またはV_LのCDR1、CDR2およびCDR3を含む。

【0209】

一実施形態では、二重特異性分子の前記NPM1c:HLA-A2特異的ドメインは、配列番号11 (A R L G Y P T T T L L P F D Y)に示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR3領域を含み、二重特異性分子の前記CD3特異的ドメインは、配列番号49 (Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D)に示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR2領域を含み、および/または配列番号47 (G Y T F T R Y T M H)もしくは配列番号48 (R Y T M H)に示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_H CDR1領域を含む。一部の実施形態では、そのような二重特異性分子は、各々の抗原結合抗体のV_L CDRをさらに含む。例えば、二重特異性分子の前記NPM1c:HLA-A2特異的ドメインは、配列番号8に示されるアミノ酸配列(Q Q S Y S T P L T)を含む少なくとも1つのV_L CDR3領域、配列番号7 (A A S)のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_L CDR2領域を含み、および/または前記CD3特異的ドメインは、配列番号51 (R A S S S V S Y M N)として示されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのV_L CDR1領域を含む。一実施形態では、上記で言及されたCDR(例えば、CDR1、CDR2、CDR3)は、単一の二重特異性分子1つに含まれる。

20

30

【0210】

本開示の一実施形態では、NPM1c:HLA-A2およびCD3二重特異性分子は、抗CD3抗体の重鎖および軽鎖両方のCDR1、CDR2およびCDR3を含む。本開示の一実施形態では、NPM1c:HLA-A2およびCD3二重特異性分子は、抗NPM1c:HLA-A2抗体の重鎖および軽鎖両方のCDR1、CDR2およびCDR3を含む。本開示の一部の実施形態では、本開示のNPM1c:HLA-A2およびCD3二重特異性分子は、抗CD3抗体の重鎖および軽鎖両方のCDR1、CDR2およびCDR3、ならびに抗NPM1c:HLA-A2抗体の重鎖および軽鎖両方のCDR1、CDR2およびCDR3を含む。

40

【0211】

一実施形態では、本明細書で言及される抗CD3 CDRは、Kabat番号付けシステムに従う。Kabat番号付けスキームは、抗体における残基の一貫した様式での番号付けのために広く採用されている基準である(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991。これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0212】

本開示の一実施形態では、NPM1c:HLA-A2およびCD3二重特異性分子は、

50

(a) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む N P M 1 c : H L A - A 2 重鎖可変領域 (V_H) ; および / または配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む N P M 1 c : H L A - A 2 軽鎖可変領域 (V_L) ;

ならびに

(b) C D 3 特異的抗体 (例えば、 O K T - 3、 X 3 5 - 3、 V I T 3、 B M A 0 3 0 (B W 2 6 4 / 5 6)、 C L B - T 3 / 3、 C R I S 7、 Y T H 1 2 . 5、 F 1 1 1 - 4 0 9、 T R - 6 6、 W T 3 1、 W T 3 2、 S P v - T 3 b、 1 1 D 8、 X I I I - 1 4 1、 X I I I - 4 6、 X I I I - 8 7、 1 2 F 6、 T 3 / R W 2 - 8 C 8、 T 3 / R W 2 - 4 B 6、 O K T 3 D、 M - T 3 0 1、 S M C 2 および F 1 0 1 . 0 1 からなる群から選択される抗体) 由来の C D 3 重鎖可変領域 (V_H) および / または軽鎖可変領域 (V_L) を含む。

10

【 0 2 1 3 】

本開示の一実施形態では、 N P M 1 c : H L A - A 2 および C D 3 二重特異性分子は、

(a) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む N P M 1 c : H L A - A 2 重鎖可変領域 (V_H) ; および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む N P M 1 c : H L A - A 2 軽鎖可変領域 (V_L) ;

ならびに

(b) C D 3 特異的抗体 (例えば、 O K T - 3、 X 3 5 - 3、 V I T 3、 B M A 0 3 0 (B W 2 6 4 / 5 6)、 C L B - T 3 / 3、 C R I S 7、 Y T H 1 2 . 5、 F 1 1 1 - 4 0 9、 T R - 6 6、 W T 3 1、 W T 3 2、 S P v - T 3 b、 1 1 D 8、 X I I I - 1 4 1、 X I I I - 4 6、 X I I I - 8 7、 1 2 F 6、 T 3 / R W 2 - 8 C 8、 T 3 / R W 2 - 4 B 6、 O K T 3 D、 M - T 3 0 1、 S M C 2 および F 1 0 1 . 0 1 からなる群から選択される抗体) 由来の C D 3 重鎖可変領域 (V_H) および軽鎖可変領域 (V_L) を含む。

20

【 0 2 1 4 】

ナチュラルキラー (N K) 細胞活性は、活性化シグナルおよび抑制シグナルの両方を含む複雑な機構によって調節される。 H L A クラス I 欠損標的細胞の N K 細胞媒介性の認識および殺滅において重要な役割を果たす、いくつかの異なる N K 細胞受容体が同定されている。受容体の 1 つは、 N K 細胞に特異的ではないが、 F c R I I I A (C D 1 6 A) であり、これは N K 細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) に関与する。別の N K 細胞受容体は、 I g スーパーファミリーのメンバーである N K p 4 6 である。これは N K 細胞に特異的であり、特異的な m A b によって誘導されるその架橋は強い N K 細胞活性化を招き、それは細胞内 C a⁺⁺ レベルの増加、細胞傷害性の誘導、およびリンホカイン遊離をもたらす。

30

【 0 2 1 5 】

一部の態様では、本開示の二重特異性分子 (例えば、二重特異性抗体または断片) は、 N P M 1 c : H L A - A 2 および N K p 4 6 に同時に結合する。一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、腫瘍細胞上に発現または提示された N P M 1 c : H L A - A 2 および N K 細胞上に発現された N K p 4 6 に同時に結合する。一部の実施形態では、本二重特異性分子は、 N P M 1 c : H L A - A 2 を認識する単鎖可変 (s c F v) 断片、および N K p 4 6 に結合するその抗体または抗原結合断片 (例えば、 s c F v) を含む。 N K p 4 6 に特異的に結合する抗体および / または抗原結合断片は、当技術分野で公知である (例えば、国際公開第 1 5 / 1 9 7 5 9 3 号パンフレット、国際公開第 1 7 / 1 1 4 6 9 4 号パンフレットを参照) 。

40

【 0 2 1 6 】

一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子 (例えば、二重特異性抗体または断片) は、 N P M 1 c : H L A - A 2 および C D 1 6 A に同時に結合する。一部の実施形態では、本開示の二重特異性分子は、腫瘍細胞上に発現または提示された N P M 1 c : H L A - A 2 および N K 細胞上に発現された C D 1 6 A に同時に結合する。一部の実施形態では、本二重特異性分子は、 N P M 1 c : H L A - A 2 を認識する単鎖可変 (s c F v) 断片、

50

およびCD16Aに結合するその抗体または抗原結合断片（例えば、s c F v）を含む。CD16Aに特異的に結合する抗体および/または抗原結合断片は、当技術分野で公知である（例えば、Stein et al., (2012) Antibodies 1:88-123、およびそこに引用されている参考文献を参照）。

【0217】

一部の実施形態では、本開示によって提供される二重特異性分子のNK細胞への結合により、NK細胞が活性化される。一部の実施形態では、本開示によって提供される二重特異性分子のNK細胞への結合により、NK細胞の抗腫瘍活性が誘導される。一部の実施形態では、本開示によって提供される二重特異性抗体のNK細胞への結合により、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）が誘導される。

10

【0218】

したがって、一部の実施形態では、本開示は、

(i) クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン；および

(ii) 以下のもの：CD3、NKp46、CD16A、CD40、CD47、4-1BB、TGF-、LAG-3、PD-1、TIM-3、CTLA-4、OX-40、NKp30、NKG2A、NKG2DまたはDNAM-1のうちの1つに特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン

を含む二重特異性抗原結合ポリペプチドを提供する。

20

【0219】

一部の実施形態では、本開示は、

(i) クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン；および

(ii) CD3（例えば、ヒトCD3）に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、T細胞上に発現されたヒトCD3に特異的に結合する。

【0220】

一部の実施形態では、本開示は、

(i) クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン；および

(ii) NKp46（例えば、ヒトNKp46）に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン

を含む二重特異性抗原結合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、ナチュラルキラー（NK）細胞上に発現されたヒトNKp46に特異的に結合する。

30

【0221】

一部の実施形態では、本開示は、

(i) クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン；および

(ii) CD16A（例えば、ヒトCD16A）に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン

を含む二重特異性抗原結合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、NK細胞上に発現されたヒトCD16Aに特異的に結合する。

40

【0222】

一部の実施形態では、NPM1cネオエピトープは、以下のものから選択されるアミノ酸配列を含む：AIQDLCAV（配列番号71）、CLAVEEVSL（配列番号7

50

2)、VEEVSLRK(配列番号73)、AVEEVSLR(配列番号74)、AVEEVSLRK(配列番号75)およびCLAVEEVSLRK(配列番号76)。一実施形態では、NPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列AIQDLCLAV(配列番号1)を含む。

【0223】

一実施形態では、MHCクラスIタンパク質は、HLA-A*02アレルグループを含むHLA-Aアレルによってコードされる。一実施形態では、HLA-AアレルはHLA-A*02:01である。

【0224】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)を含み、VHは配列番号5に示されるアミノ酸配列を含み、VLは配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0225】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)を含み、VHは、配列番号5に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号3に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含む。

【0226】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、VHは、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、VHは、配列番号5に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号3に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含む。

20

【0227】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号9、10および11に示されるVH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3配列、ならびに/またはそれぞれ配列番号6、7および8に示されるVL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3配列を含む。

30

【0228】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号9、10および11に示されるVH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3配列、ならびにそれぞれ配列番号6、7および8に示されるVL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3配列を含む。

【0229】

一実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、scFv、Fab、またはF(ab')₂を含み、第2の抗原結合ドメインは、scFv、およびFab、またはF(ab')₂を含む。

40

【0230】

本開示に従って使用される抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖を、当技術分野で公知の従来手法を使用して、例えば、アミノ酸欠失、挿入、置換、付加、および/もしくは組換え、ならびに/または当技術分野で公知の任意の他の改変を単独または組合せのいずれかで使用することによって、さらに改変することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎となるDNA配列にそのような改変を導入するための方法は、当業者に周知である；例えば、Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.を参照。言及された改変は好ましくは核酸レベルで行われる。

50

【0231】

二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む種々の方法によって作製することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)を参照。伝統的に、二重特異性抗体の組換え作製は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づいており、2つの重鎖/軽鎖対は、異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, (1983) Nature 305:537-539)。所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させることができる。重鎖可変領域の融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。二重特異性抗体を生成させるための例示的な現在知られる方法のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., (1986) Methods Enzymol. 121:210; PCT Publication No. WO 96/27011; Brennan et al., (1985) Science 229:81; Shalaby et al., J. Exp. Med. (1992) 175:217-225; Kostelny et al., (1992) J. Immunol. 148 (5):1547-1553; Hollinger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Gruber et al., (1994) J. Immunol. 152:5368;およびTutt et al., (1991) J. Immunol. 147:60を参照。二重特異性抗体には、架橋抗体またはヘテロコンジュゲート抗体も含まれる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便利な架橋方法を使用して製造することができる。好適な架橋剤は当技術分野で周知であり、米国特許第4,676,980号明細書に、多数の架橋手法とともに開示されている。

10

20

【0232】

組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体断片を製造し、単離するための様々な手法も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して作製されている。例えば、Kostelny et al. (1992) J Immunol 148(5):1547-1553を参照。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に連結され得る。抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロ二量体を形成することができる。この方法を、抗体ホモ二量体の作製のために利用することもできる。Hollinger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448によって記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的な機構を提供している。この断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を許容するには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、1つの断片のVHおよびVLドメインは、別の断片の相補的VLおよびVHドメインと強制的に対合し、それによって2つの抗原結合部位が形成される。単鎖Fv(scFv)二量体の使用によって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。例えば、Gruber et al. (1994) J Immunol 152:5368を参照。あるいは、抗体は、例えば、Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062に記載されているような「直鎖状抗体」であり得る。手短に述べると、これらの抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む。直鎖状抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る。

30

40

【0233】

本開示はまた、多重特異性抗体のパリアント形態、例えば、Wu et al. (2007) Nat Biotechnol 25(11):1290-1297に記載されている二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig)分子も包含する。DVD-Ig分子は、2つの異なる親抗体からの2つの異なる軽鎖可変ドメイン(VL)が、組換えDNA技術によって直接または短いリンカーを介してタンデムに連結され、次いで軽鎖定常ドメインが連結されるように設計される。同様に、重鎖は、タンデムに連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン(VH)と、それに続く定常ドメインCH1およびFc領域を含む。2つの親抗体からDVD-Ig分子を製造するための方法は、例えば、PCT公開国際公開第08/024188号パンフレットおよび国際公開第07/024715号パンフレットにさらに記載されている。一部

50

の実施形態では、二重特異性抗体は、第2の特異性を有する軽鎖可変領域が抗体全体の重鎖可変領域に融合されているFab-in-Tandem免疫グロブリンである。そのような抗体は、例えば、国際特許出願公開第2015/103072号パンフレットに記載されている。

【0234】

キメラ抗原受容体

一態様では、細胞外ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体、もしくはその抗原結合断片、または二重特異性分子を含む、CARが本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるキメラ抗原受容体(CAR)は、ネオ抗原(例えば、がんネオ抗原または腫瘍ネオ抗原)に結合する細胞外ドメインを含む。がんネオ抗原は、がん細胞に起こる変異が原因で、そのようながん細胞のみに存在する抗原である。がん抗原は、細胞内で発現されて、MHCクラスIタンパク質によってがん細胞の表面に提示され得る。例えば、本明細書で想定されるCARによって標的化されるがんネオ抗原は、NPM1c:HLA-A2であり得る。ある特定の実施形態では、本開示の抗体または抗原結合断片(例えば、scFv)を使用して、キメラ抗原受容体(CAR)を製造することができる。一実施形態では、NPM1c:HLA-A2に結合する抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)を使用して、キメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチドを生成させる。ある特定の実施形態では、細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、細胞外結合ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体、もしくはその抗原結合断片、または二重特異性分子を含み、そのような抗体、その抗原結合断片、または二重特異性分子が、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質(例えば、HLA-2)と複合体を形成した(またはそれによって提示される)変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープ(例えば、NPM1cネオエピトープ)に結合する、CARが本明細書において提供される。

【0235】

CARは、遺伝子操作された人工的な膜結合タンパク質であり、免疫エフェクター細胞において発現された場合に、そのような免疫エフェクター細胞を抗原に導き、一般に、免疫エフェクター細胞を刺激して、抗原を提示する細胞を殺滅する。したがって、キメラ抗原受容体(CAR)を使用して、免疫エフェクター細胞に所望の抗原特異性、例えば、抗腫瘍特異性を付与することができる(特に、抗原特異性はCARの細胞外ドメインによって付与される)。

【0236】

CARは一般に、細胞上に提示される1つまたは複数の抗原に結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞外ドメインが1つまたは複数の抗原に結合した際に活性化シグナルを免疫エフェクター細胞に伝達する細胞内ドメインとを含む。ある特定の実施形態では、CARは、以下の3つのドメインを含有する: 1)典型的にはシグナルペプチド、リガンドまたは抗原認識領域(例えば、scFv)および可動性スパーサーを含む、細胞外ドメイン; 2)膜貫通(TM)ドメイン; 3)典型的には1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメイン(細胞質ドメインとしても知られる)。CARの細胞外ドメインは細胞の外側に存在し、細胞外空間に露出されているため、そのリガンド/抗原との相互作用のためにアクセス可能である。TMドメインは、CARがエフェクター細胞の細胞膜に係留されることを可能にする。CARの細胞内ドメインは、細胞外ドメインの由来となったタンパク質とは異なるシグナル伝達タンパク質に由来する1つまたは複数の細胞質ドメインを含み得る。細胞内ドメインは、CARがそのリガンド/抗原に結合した際にエフェクター細胞活性化を助ける。一部の実施形態では、エフェクター細胞活性化は、サイトカインおよびケモカインの産生の誘導、ならびにエフェクター細胞の細胞溶解活性の活性化を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞傷害性を腫瘍細胞へと再方向付けする。

【0237】

10

20

30

40

50

CARの抗原結合ドメインと標的細胞の表面上のその標的抗原とのエンゲージメントは、CARのクラスター化をもたらし、活性化刺激をCAR含有細胞に送達する。一部の実施形態では、CARの主な特徴は、免疫エフェクター細胞の特異性を再方向付けし、それによって、増殖、サイトカイン産生、ファゴサイトーシス、またはモノクローナル抗体、可溶性リガンド、もしくは細胞特異的共受容体の細胞特異的標的化能力を活用する主要組織適合複合体(MHC)非依存的な様式で標的抗原発現細胞の細胞死を媒介し得る分子の産生を誘発する、その能力である。CD3 またはFcRγからのシグナル伝達ドメインを含有するように操作されたscFvに基づくCARは、T細胞活性化およびエフェクター機能のための強力なシグナルを送達することが示されているが、共刺激シグナルがない場合にT細胞の生存および増殖を促進するシグナルを誘発するには十分ではない可能性がある。結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、およびCD3 またはFcRγに由来するシグナル伝達ドメインを、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、CD28、CD137、CD134およびCD278に由来する細胞内共刺激ドメイン)とともに含有する新世代のCARは、CAR発現T細胞において、より効果的に抗腫瘍活性を導くことに加えて、サイトカイン分泌、溶解活性、生存および増殖を増加させることが、*in vitro*、動物モデルおよびがん患者において示されている(Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365)。

【0238】

一部の態様では、細胞外(抗原結合)ドメイン、膜貫通ドメイン、および抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞を刺激するのに十分なCD3 配列の細胞質配列を含む細胞内(細胞質)ドメイン、ならびに任意選択で、抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞の共刺激をもたらす、1つまたは複数の(例えば、2つ、3つ、または4つの)共刺激タンパク質の細胞質配列(例えば、B7-H3、BTLA、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD80、CD160、CD244、ICOS、LAG3、LFA-1、LIGHT、NKG2C、4-1BB、OX40、PD-1、PD-L1、TIM3、2B4、DAP10、CD137、DAP12、およびCD83に特異的に結合するリガンドのうちの1つまたは複数の細胞質配列)を含むCARが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、CARは、リンカーをさらに含み得る。例示的な細胞外(抗原結合)ドメイン、リンカー、膜貫通ドメイン、および細胞内(細胞質)ドメインを含む、CARおよびCAR発現免疫エフェクター細胞のさらなる態様は、例えば、Kakarla et al., *Cancer J.* 20:151-155, 2014; Srivastava et al., *Trends Immunol.* 36:494-502, 2015; Nishio et al., *Oncoimmunology* 4(2): e988098, 2015; Ghorashian et al., *Br. J. Haematol.* 169:463-478, 2015; Levine, *Cancer Gene Ther.* 22:79-84, 2015; Jensen et al., *Curr. Opin. Immunol.* 33:9-15, 2015; Singh et al., *Cancer Gene Ther.* 22:95-100, 2015; Li et al., *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 22:1753-1756, 2014; Gill et al., *Immunol. Rev.* 263:68-89, 2015; Magee et al., *Discov. Med.* 18:265-271, 2014; Gargett et al., *Front. Pharmacol.* 5:235, 2014; Yuan et al., *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 22:1137-1141, 2014; Pedgram et al., *Cancer J.* 20:127-133, 2014; Eshhar et al., *Cancer J.* 20:123-126, 2014; Ramos et al., *Cancer J.* 20:112-118, 2014; Maus et al., *Blood* 123:2625-2635, 2014; Jena et al., *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 9:50-56, 2014; Maher et al., *Curr. Gene Ther.* 14:35-43, 2014; Riches et al., *Discov. Med.* 16:295-302, 2013; Cheadle et al., *Immunol. Rev.* 257:83-90, 2014; Davila et al., *Int. J. Hematol.* 99:361-371, 2014; Xu et al., *Cancer Lett.* 343:172-178, 2014; Kochenderfer et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10:267-276, 2013; Hosing et al., *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 8:60-70, 2013; Hombach et al., *Curr. Mol. Med.* 13:1079-1088, 2013; Xu et al., *Leuk. Lymphoma* 54:255-260, 2013; Gilham et al., *Trends Mol. Med.* 1

8:377-384, 2012; Lipowska-Bhalla et al., Cancer Immunol. Immunother. 61:953-962, 2012; Chmielewski et al., Cancer Immunol. Immunother. 61:1269-1277, 2013; Jena et al., Blood 116:1035-1044, 2010; Dotti et al, Immunology Reviews 257(1): 107-126, 2013; Dai et al., Journal of the National Cancer Institute 108(7): djv439, 2016; Wang and Riviere, Molecular Therapy-Oncolytics 3: 16015, 2016 ; 米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 0 5 7 6 0 9 号明細書号明細書 ; 同 2 0 1 8 / 0 0 3 7 6 2 5 号明細書 ; 同 2 0 1 7 / 0 3 6 2 2 9 5 号明細書 ; 同 2 0 1 7 / 0 1 3 7 7 8 3 号明細書 ; 同 2 0 1 6 / 0 1 5 2 7 2 3 号明細書、同 2 0 1 6 / 0 2 0 6 6 5 6 号明細書、同 2 0 1 6 / 0 1 9 9 4 1 2 号明細書、同 2 0 1 6 / 0 2 0 8 0 1 8 号明細書、同 2 0 1 5 / 0 2 3 2 8 8 0 号明細書、同 2 0 1 5 / 0 2 2 5 4 8 0 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 2 2 4 1 4 3 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 2 2 4 1 4 2 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 9 0 4 2 8 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 9 6 5 9 9 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 5 2 1 8 1 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 4 0 0 2 3 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 1 8 2 0 2 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 1 1 0 7 6 0 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 9 9 2 9 9 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 9 3 8 2 2 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 9 3 4 0 1 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 5 1 2 6 6 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 5 0 7 2 9 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 2 4 4 8 2 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 2 3 9 3 7 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 1 7 1 4 1 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 1 7 1 3 6 号明細書 ; 同 2 0 1 5 / 0 0 1 7 1 2 0 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 7 0 0 4 5 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 7 0 0 1 7 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 6 9 9 7 7 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 4 9 4 0 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 2 8 8 1 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 2 2 2 7 5 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 2 2 2 1 6 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 2 2 2 1 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 2 2 1 8 3 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 1 4 7 9 5 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 0 8 2 5 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 3 0 1 9 9 3 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 9 6 4 9 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 9 4 7 8 4 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 8 6 9 7 3 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 4 9 0 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 4 8 0 1 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 1 6 3 5 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 1 5 8 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 1 5 8 1 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 7 1 5 7 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 5 5 3 6 3 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 4 2 7 0 1 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 4 2 0 4 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 2 7 2 7 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 2 1 9 9 7 5 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 7 0 1 1 4 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 3 4 7 2 0 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 3 4 1 4 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 2 0 6 2 2 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 2 0 1 3 6 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 0 6 4 4 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 1 0 6 4 4 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 0 9 9 3 4 0 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 0 8 6 8 2 8 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 0 6 5 6 2 9 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 0 5 0 7 0 8 号明細書 ; 同 2 0 1 4 / 0 0 2 4 8 0 9 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 3 4 4 0 3 9 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 3 2 3 2 1 4 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 3 1 5 8 8 4 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 8 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 8 8 3 6 8 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 8 7 7 5 2 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 8 7 7 4 8 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 8 0 2 2 1 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 8 0 2 2 0 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 6 6 5 5 1 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 1 6 5 2 8 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 2 0 2 6 2 2 号明細書 ; 同 2 0 1 3 / 0 0 7 1 4 1 4 号明細書 ; 同 2 0 1 2 / 0 3 2 1 6 6 7 号明細書 ; 同 2 0 1 2 / 0 3 0 2 4 6 6 号明細書 ; 同 2 0 1 2 / 0 3 0 1 4 4 8 号明細書 ; 同 2 0 1 2 / 0 3 0 1 4 4 7 号明細書 ; 同 2 0 1 2 / 0 0 6 0 2 3 0 号明細書 ; 同 2 0 1 1 / 0 2 1 3 2 8 8 号明細書 ; 同 2 0 1 1 / 0 1 5 8 9 5 7 号明細書 ; 同 2 0 1 1 / 0 1 0 4 1 2 8 号明細書 ; 同 2 0 1 1 / 0 0 3 8 8 3 6 号明細書 ; 同 2 0 0 7 / 0 0 3 6 7 7 3 号明細書 ; および同 2 0 0 4 / 0 0 4 3 4 0 1 号明細書に記載されている。例示的な細胞外（抗原結合）ドメイン、リンカー、膜貫通ドメイン、および細胞内（細胞質）ドメインを含む C A R および C A R 発現免疫エフェクター細胞のさらなる態様は、国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 8 5 9 5 号パンフレット ; 国際公開第 1 2 / 0 7 9 0 0 0 号パンフレット ; 同 2 0 1 5 / 0

10

20

30

40

50

141347号パンフレット；同2015/0031624号パンフレット；同2015/0030597号パンフレット；同2014/0378389号パンフレット；同2014/0219978号パンフレット；同2014/0206620号パンフレット；同2014/0037628号パンフレット；同2013/0274203号パンフレット；同2013/0225668号パンフレット；同2013/0116167号パンフレット；同2012/0230962号パンフレット；同2012/0213783号パンフレット；同2012/0093842号パンフレット；同2012/0071420号パンフレット；同2012/0015888号パンフレット；同2011/0268754号パンフレット；同2010/0297093号パンフレット；同2010/0158881号パンフレット；同2010/0034834号パンフレット；同2010/0015113号パンフレット；同2009/0304657号パンフレット；同2004/0043401号パンフレット；同2014/0322253号パンフレット；同2015/0118208号パンフレット；同2015/0038684号パンフレット；同2014/0024601号パンフレット；同2012/0148552号パンフレット；同2011/0223129号パンフレット；同2009/0257994号パンフレット；同2008/0160607号パンフレット；同2008/0003683号パンフレット；同2013/0121960号パンフレット；同2011/0052554号パンフレット；および同2010/0178276号パンフレットに記載されている。

10

【0239】

一部の態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含むCARであって、細胞外ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体、もしくはその抗原結合断片、または二重特異性分子を含むCARが、本明細書において提供される。一部の態様では、細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、細胞外結合ドメインが、本明細書に記載されるいずれかの抗体、もしくはその抗原結合断片、または二重特異性分子を含み、そのような抗体、その抗原結合断片、または二重特異性分子が、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質と複合体を形成した(またはそれによって提示される)NPM1cネオエピトープを含む抗原に結合するCARが、本明細書において提供される。

20

【0240】

一部の態様では、実施例の項に記載されている、NPM1c CARの細胞内、膜貫通および/または細胞外ドメインを有するキメラ抗原受容体(CAR)が、本明細書において提供される(例えば、実施例3を参照)。

30

【0241】

一部の態様では、以下：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、2B4、DAP10、CD137およびDAP12、からなる群から選択される、1つまたは複数の共刺激分子の1つまたは複数の共刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインと、任意選択で、4-1BB共刺激ドメインとを含む細胞内ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。一部の態様では、CD3-ゼータ、CD8、CD28、NKG2D、CD16、NKp44またはNKp46の膜貫通ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、CD8膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。一部の態様では、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)を含む細胞外ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、クラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質(例えば、HLA-A2)と複合体を形成した(またはそれによって提示される)変異型ヌクレオフォスミンタンパク質エピトープ(例えば、NPM1cネオエピトープ)を含む抗原に特異的に結合する、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)を含む細胞外ドメインを含むCARが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、VHおよびVLを含む、本明細書に記載されるいずれかの抗体または

40

50

その抗原結合断片（例えば、s c F v）を含む細胞外ドメインを含むC A Rであって、V Hが、配列番号5のアミノ酸配列または配列番号5と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列を含み、V Lが、配列番号3のアミノ酸配列または配列番号3と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列を含むC A Rが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、配列番号9のアミノ酸配列を有するV H C D R 1、配列番号10のアミノ酸配列を有するV H C D R 2、配列番号11のアミノ酸配列を有するC D R 3を含むV Hを含み、ならびに/または配列番号6のアミノ酸配列を有するV L C D R 1、配列番号7のアミノ酸配列を有するV L C D R 2、および配列番号8のアミノ酸配列を有するV L C D R 3を含むV Lを含む、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片（例えば、s c F v）を含む細胞外ドメインを含むC A Rが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、配列番号5のアミノ酸配列を有するV HのC D RであるV H C D R 1、V H C D R 2およびV H C D R 3を含むV Hを含み、ならびに/または配列番号3のアミノ酸配列を有するV LのC D RであるV L C D R 1、V L C D R 2およびV L C D R 3を含むV Lを含む、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片（例えば、s c F v）を含む細胞外ドメインを含むC A Rが、本明細書において提供される。特定の実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列を有するs c F v、または配列番号2と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列を有するs c F vを含む細胞外ドメインを含むC A Rが、本明細書において提供される。

10

20

【0242】

本明細書に提供されるC A Rの細胞外、膜貫通および細胞内ドメインの例について、以下に記載する。

【0243】

C A Rの細胞外（抗原結合）ドメインを含む、抗体抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：モノクローナル抗体（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g E、およびI g D）（例えば、完全ヒト抗体またはキメラ（例えば、ヒト化）抗体）、抗体の抗原結合断片（例えば、F a b、F a b'、またはF (a b')₂断片）（例えば、完全ヒト抗体またはキメラ（例えば、ヒト化）抗体の断片）、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、s c F v、s c F v - F c、(s c F v)₂、s c F a b、b i s - s c F v、h c - I g G、B i T E、単一ドメイン抗体（例えば、V - N A RドメインまたはV h Hドメイン）、I g N A R、および多重特異性（例えば、二重特異性抗体）抗体。一実施形態では、抗原結合ドメインはs c F vを含む。これらの抗原結合ドメインを製造する方法は当技術分野で公知である。

30

【0244】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的抗原に特異的に結合し得る抗体、例えば、免疫グロブリン分子（例えば、軽鎖または重鎖免疫グロブリン分子）および免疫グロブリン分子の免疫学的活性（抗原結合）断片の、少なくとも1つの（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの）C D R（例えば、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン由来の3つのC D Rのうちのいずれか、および/または免疫グロブリン重鎖可変ドメイン由来の3つのC D Rのうちのいずれか）を含む。

40

【0245】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖抗体（例えば、V - N A RドメインもしくはV h Hドメイン、または本明細書に記載される単鎖抗体のいずれか）である。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体分子全体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体）またはマルチマー抗体（例えば、二重特異性抗体）である。

【0246】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインには、抗体断片および多重特異性（例えば、二重特異性）抗体または抗体断片が含まれる。抗体およびその抗原結合断片の例には、単鎖

50

Fv (scFv)、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂、ジスルフィド連結Fv (sdFv)、Fv、およびVLドメインまたはVHドメインのいずれかを含有する断片が含まれるが、これらには限定されない。

【0247】

本明細書において提供されるさらなる抗原結合ドメインは、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性（マルチマー、例えば、二重特異性）の、ヒト抗体、キメラ抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ）、単鎖抗体、細胞内で生成される抗体（すなわち、イントラボディ）、およびそれらの抗原結合断片である。抗体またはその抗原結合断片は、任意の型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂）、またはサブクラスのものであり得る。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、IgG1抗体またはその抗原結合断片である。一部の例では、抗原結合ドメインは、IgG4抗体またはその抗原結合断片である。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンである。

10

【0248】

抗原結合ドメインのさらなる例は、IgGの抗原結合断片（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の抗原結合断片）（例えば、ヒトまたはヒト化IgG、例えば、ヒトまたはヒト化IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4の抗原結合断片）、IgAの抗原結合断片（例えば、IgA1またはIgA2の抗原結合断片）（例えば、ヒトまたはヒト化IgA、例えば、ヒトまたはヒト化IgA1もしくはIgA2の抗原結合断片）、IgDの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgDの抗原結合断片）、IgEの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgEの抗原結合断片）、またはIgMの抗原結合断片（例えば、ヒトまたはヒト化IgMの抗原結合断片）である。

20

【0249】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、例えば、食塩水中またはリン酸緩衝食塩水中で、特定の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）に、約 1×10^{-7} Mまたはより強い（例えば、約 1×10^{-8} Mもしくはより強い、約 1×10^{-9} Mもしくはより強い、約500 nMもしくはより強い、約100 nMもしくはより強い、約25 nMもしくはより強い、約15 nMもしくはより強い、約7 nMもしくはより強い、約5 nMまたはそれ未満、または約1 nMもしくはより強い）親和性（K_D）で結合することができる。

30

【0250】

当業者には理解されるように、CARに含められる抗原結合ドメインの選択は、それを必要とする対象において標的とされる細胞（例えば、がん細胞または腫瘍）の表面を規定するリガンドの型および数に依存する。例えば、抗原結合ドメインを、腫瘍特異的抗原（TSA）、例えば、がんネオ抗原を認識するように選択してもよい。例えば、腫瘍特異的抗原は、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）、例えば、NPM1c:HLA-A2と複合体を形成した（またはそれによって提示される）NPM1cネオ抗原であってもよい。一部の実施形態では、NPM1cネオ抗原は、アミノ酸配列AIQDLCLAV（配列番号1）を含む。

【0251】

一部の実施形態では、CAR分子は、急性骨髄性白血病の腫瘍抗原を認識する抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原（TSA）、例えば、急性骨髄性白血病ネオ抗原である。TSAは、腫瘍細胞に特有であり、体内の他の細胞上には存在しない。一実施形態では、腫瘍抗原は腫瘍特異的抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍特異的抗原は、患者の腫瘍細胞を配列決定し、腫瘍中にのみ見出される変異したタンパク質を同定することによって決定される。これらの抗原は、「ネオ抗原」と称される。ネオ抗原がひとたび同定されると、それに対して治療用抗体を産生させて、本明細書に記載される方法に使用することができる。一実施形態では、ネオ抗原はNPM1cネオ抗原である。一実施形態では、NPM1cネオ抗原は、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）、例えば、NPM1c:HLA-A2と複合体を形成している

40

50

50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、約20アミノ酸、もしくは約18アミノ酸まで；約18アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、約25アミノ酸、もしくは約20アミノ酸まで；約20アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、約30アミノ酸、もしくは約25アミノ酸まで；約25アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、約35アミノ酸、もしくは約30アミノ酸まで；約30アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、もしくは約35アミノ酸まで；約35アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、もしくは約40アミノ酸まで；約40アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、約60アミノ酸、約50アミノ酸、約40アミノ酸、もしくは約50アミノ酸まで；約50アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、約70アミノ酸、もしくは約60アミノ酸まで；約60アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約150アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、約80アミノ酸、もしくは約70アミノ酸まで；約70アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、約90アミノ酸、もしくは約80アミノ酸まで；約80アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、約100アミノ酸、もしくは約90アミノ酸まで；約90アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、約200アミノ酸、もしくは約100アミノ酸まで；約100アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、約300アミノ酸、もしくは約200アミノ酸まで；約200アミノ酸から約500アミノ酸、約400アミノ酸、もしくは約300アミノ酸まで；約300アミノ酸から約500アミノ酸もしくは約400アミノ酸まで；または約400アミノ酸から約500アミノ酸までの長さを有し得る。

【0254】

CARの膜貫通ドメイン

本明細書に提供されるCARは、膜貫通ドメインも含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、天然の供給源に由来し得る。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、任意の膜結合型または膜貫通タンパク質に由来し得る。本明細書に記載されるCARにおいて使用し得る膜貫通ドメインの非限定的な例は、T細胞受容体の、
、もしくは鎖、CD28、CD3、CD33、CD37、CD64、CD80、CD45、CD4、CD5、CD5、CD9、CD16、CD22、CD86、CD134、CD137、またはCD154に由来し得る（例えば、その少なくとも膜貫通配列、またはその膜貫通配列の一部を含む）。一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD4分子由来である。一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8分子由来である。

【0255】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは合成性であり得る。例えば、膜貫通ドメインが合成供給源に由来する一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、疎水性残基（例えば、ロイシンおよびバリン）を含む（例えば、主として含む）ことができる。一部の実施形態では、合成膜貫通ドメインは、合成膜貫通ドメインの末端に、フェニルアラニン、トリプト

ファン、およびバリンのトリプレットを、少なくとも1つ（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つ）含むと考えられる。一部の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8ヒンジドメインを含み得る。

【0256】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞質ドメイン内の配列に天然に付随している。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、そのドメインの他の膜貫通ドメイン（例えば、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメイン）への結合を回避するための1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10個の）アミノ酸置換によって改変され得る。

10

【0257】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるCARの膜貫通ドメインは、CD3-、CD8、CD28、NKG2D、CD16、Nkp44、またはNkp46の膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態では、本明細書に提供されるCARの膜貫通ドメインは、CD3-、CD8またはCD28の膜貫通ドメインを含む。これらの実施形態のうちの一部では、CARの細胞内ドメインは、以下のもの：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される共刺激分子の共刺激ドメインを含む。

【0258】

CARの細胞内（細胞質）ドメイン

細胞内ドメインは、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞、NK細胞またはマクロファージの活性化を引き起こすシグナルを伝達するように機能することが知られている任意のポリペプチドドメインであり得る。そのようなドメインまたはモチーフは、CARの細胞外ドメインの標的抗原への結合に応答したTリンパ球の活性化のために必要な一次抗原結合シグナルを伝達することができる。細胞内ドメインの例には、ILR鎖、CD28、4-1BBおよびCD3が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0259】

典型的には、細胞内ドメインは、ITAM（免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ）を含む。

30

【0260】

一実施形態では、細胞内ドメインは、CD3シグナル伝達配列（例えば、そのITAM含有部分）であるか、またはそれを含む。一実施形態では、細胞内ドメインは、リンパ球受容体鎖を含む。一実施形態では、細胞内ドメインは、TCR/CDR3複合体タンパク質を含む。一実施形態では、細胞内ドメインは、Fc受容体サブユニットを含む。一実施形態では、細胞内ドメインは、IL-2受容体サブユニットを含む。

【0261】

本明細書に提供されるCARの細胞内ドメインは、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列を含むことができる：TCRを介した抗原依存性活性化を開始させるシグナル伝達配列（初代細胞質シグナル伝達配列）（例えば、CD3細胞質シグナル伝達配列）、および二次または共刺激シグナルを与えるように抗原非依存的様式で作用する共刺激タンパク質のうちの一つまたは複数の細胞質配列（二次細胞質シグナル伝達配列）。

40

【0262】

ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインが抗原に結合した場合にT細胞を刺激するのに十分なCD3の細胞質配列、および任意選択で、T細胞の共刺激をもたらす、共刺激タンパク質のうちの一つまたは複数の細胞質配列（例えば、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3、2B4、DAP10、CD137、DAP12、CD83に特異的に結合するリガンド、および本明細書に記載されるかま

50

たは当技術分野で公知である I T A M 配列のいずれかのうちの 1 つまたは複数の細胞質配列)を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む C A R が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、共刺激タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメイン全体が、C A R の細胞内ドメインに含められる。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、共刺激タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分(例えば、C A R 発現免疫エフェクター細胞においてエフェクター機能シグナルを伝達する細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分)を含む。細胞内ドメインに含めることができる細胞内シグナル伝達ドメインの非限定的な例としては、抗原受容体のエンゲージメント後にシグナル伝達を開始するために協働して作用する T 細胞受容体(T C R)および共受容体の細胞質配列、ならびに少なくとも 1 つ(例えば、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 個)の置換を含み、同じまたはほぼ同じ機能的な能力を有する、これらの配列の任意のバリエーションが挙げられる。

10

【0263】

一部の実施形態では、C A R の細胞内ドメインは、C D 3 シグナル伝達ドメインを、それ自体で、または C A R の状況において有用な任意の他の所望の細胞質シグナル伝達配列と組み合わせて含むように設計することができる。一部の実施形態では、C A R の細胞質ドメインは、C D 3 鎖部分および共刺激細胞質シグナル伝達配列を含み得る。共刺激細胞質シグナル伝達配列は、共刺激タンパク質(例えば、C D 27、C D 28、4 - I B B (C D 137)、O X 40、C D 30、C D 40、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 - 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、および C D 83 に特異的に結合するリガンド)の細胞質シグナル伝達配列を含む C A R の一部分を指す。

20

【0264】

一部の実施形態では、C A R の細胞内ドメイン内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムな順序で配置される。一部の実施形態では、C A R の細胞内ドメイン内の細胞質シグナル伝達配列は、特定の順序で互いに連結される。一部の実施形態では、リンカー(例えば、本明細書に記載されるリンカーのいずれか)を、異なる細胞質シグナル伝達配列の間に連鎖を形成するために使用することができる。

【0265】

一部の実施形態では、細胞内ドメインは、C D 3 の細胞質シグナル伝達配列および共刺激タンパク質 C D 28 の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、C D 3 の細胞質シグナル伝達配列および共刺激タンパク質 4 - I B B の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、C D 3 の細胞質シグナル伝達配列ならびに共刺激タンパク質 C D 28 および 4 - 1 B B の細胞質シグナル伝達配列を含むように設計される。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、4 - 1 B B の細胞質シグナル伝達配列を含まない。

30

【0266】

一部の実施形態では、C A R は、C D 28、C D 137 (4 - 1 B B としても知られる)、C D 134 (O X 40 としても知られる)および C D 278 (I C O S としても知られる)などのタンパク質に由来する 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含む。一部の実施形態では、C A R は、C D 137 に由来する共刺激ドメインを含まない。

40

【0267】

ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、サイトカインをさらに含む。一部の実施形態では、細胞内ドメインは、自己切断性ドメイン(例えば、P 2 A 自己切断性ペプチド)およびサイトカインをさらに含み、自己切断性ドメインの切断によりサイトカインが放出される。一部の実施形態では、自己切断性ドメイン(例えば、P 2 A 自己切断性ペプチド)およびサイトカインは、C A R タンパク質およびその細胞内ドメインの C 末端に配置される。一部の実施形態では、サイトカインは、以下のもの: I L - 12、I L - 7、I L - 13、I L - 15、I L - 4、I L - 10、T N F - 、I F N - 、T G F - および C C L 19 のうちの 1 つまたは複数である。一実施形態では、サイトカインは I L -

50

12である。一実施形態では、サイトカインはIL-7である。一実施形態では、サイトカインはIL-13である。一実施形態では、サイトカインはIL-15である。一実施形態では、サイトカインはIL-4である。一実施形態では、サイトカインはIL-10である。一実施形態では、サイトカインはTNF- α である。一実施形態では、サイトカインはIFN- γ である。一実施形態では、サイトカインはTGF- β である。一実施形態では、サイトカインはCCL19である。サイトカインを発現するように改変された免疫エフェクター細胞は、当技術分野で公知である(例えば、Adachi et al., 2018, Nature Biotechnology, doi:10.1038/nbt.4086; Liu et al., 2019, J. Immunol., doi:10.4049/jimmunol.1800033; Krenciute et al., 2017, Cancer Immunol. Res. 597):571-581, doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0376; Liu et al., 2018, Leukemia 32:520-531を参照)。ある特定の実施形態では、サイトカインを発現させるための、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞の改変は、Adachi et al., 2018, Nature Biotechnology, doi:10.1038/nbt.4086; Liu et al., 2019, J. Immunol., doi:10.4049/jimmunol.1800033; Krenciute et al., 2017, Cancer Immunol. Res. 597):571-581, doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0376; もしくはLiu et al., 2018, Leukemia 32:520-531に記載されているものと同じであるか、またはそこに記載されている方法に従う。

10

【0268】

CAR発現免疫エフェクター細胞

一態様では、本明細書に記載されるいずれかのキメラ抗原受容体(CAR)を含む免疫エフェクター細胞が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるいずれかのキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸によって形質転換された免疫エフェクター細胞が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるいずれかのキメラ抗原受容体(CAR)を発現する免疫エフェクター細胞が、本明細書において提供される。

20

【0269】

CARを保有させるかまたは発現させるために使用し得る免疫エフェクター細胞としては、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞およびマクロファージが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、免疫エフェクター細胞は、T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)である。一実施形態では、免疫エフェクター細胞はNK細胞である。一実施形態では、免疫エフェクター細胞はマクロファージである。

30

【0270】

一部の態様では、本明細書に提供される免疫エフェクター細胞は、末梢血、臍帯血、またはリンパ液から単離されているか、または増大されている。

【0271】

一部の態様では、本明細書に提供される免疫エフェクター細胞は、(本明細書に記載されるCARを発現するようなその改変の後に)それが投与される対象にとって自己性である。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される免疫エフェクター細胞は、(本明細書に記載されるCARを発現するようなその改変の後に)それが投与される対象にとって同種性である。同種免疫エフェクター細胞を使用してCAR発現免疫エフェクター細胞を調製する場合、対象における移植片対宿主病の可能性を低下させる免疫エフェクター細胞を選択することができ、または免疫エフェクター細胞を1つもしくは複数の免疫抑制剤と同時投与することができる。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は対象から得られ、任意選択で増大されて、本明細書に記載されるCARを発現するポリヌクレオチドによって形質転換され、任意選択でさらに増大される。

40

【0272】

一部の態様では、免疫エフェクター細胞は、疾患または状態(例えば、がん、例えば、AML)を有する患者に由来し、本明細書に記載されるいずれかの抗原(例えば、ネオ抗原)に対する特異性を有する少なくとも1つのCARを発現するように*in vitro*で遺伝子改変されている。例えば、抗原は、MHCクラスIタンパク質によって提示され

50

るがんネオ抗原（例えば、MHCクラスIタンパク質、例えば、NPM1c：HLA-A2と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンタンパク質ネオエピトープを含む抗原）であり得る。これらの実施形態の一部では、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）によって提示されるがんネオ抗原に対する特異性を有するCARを発現するように遺伝子改変された免疫エフェクター細胞は、次いで、患者におけるがん（例えば、NPM1c陽性がん、例えば、AML）を治療するために投与される。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、リガンドまたは抗原のCARへの特異的結合によって刺激または誘導され、同じ患者の疾患または状態の治療のために有用な、少なくとも1つのエフェクター機能（例えば、サイトカインの誘導）を果たす。一部の実施形態では、エフェクター細胞は、標的または標的細胞（例えば、がん細胞）に接触または近接した場合に、標的細胞上でそのエフェクター機能（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を発揮するT細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）である（例えば、Chang and Chen (2017) Trends Mol Med 23(5):430-450を参照）。

10

【0273】

（例えば、CARの細胞外ドメインのがんネオ抗原への結合による）CARを含む免疫エフェクター細胞の刺激は、CAR免疫エフェクター細胞の1つまたは複数の抗がん活性の活性化をもたらし得る。例えば、一部の実施形態では、CAR免疫エフェクター細胞の刺激は、サイトカインの分泌を含む、CAR免疫エフェクター細胞の細胞溶解活性またはヘルパー活性の増加をもたらし得る。

【0274】

一部の実施形態では、CARエフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、本明細書に記載されるいずれかの抗原（例えば、NPM1c：HLA-A2）に結合するCAR分子を含む。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法において有用なCAR分子（例えば、CAR T細胞）を含む免疫エフェクター細胞は、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成した（またはそれによって提示される）NPM1cネオエピトープ、例えば、NPM1c：HLA-A2に結合する細胞外ドメインを含むCARを発現する。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法において有用なCAR分子を含む免疫エフェクター細胞（例えば、CAR T細胞）は、NPM1c：HLA-A2結合ドメインを含むCARを発現する。

20

【0275】

T細胞のそのコグネイト抗原への長時間の曝露は、エフェクター機能の枯渇をもたらし、感染細胞または形質転換細胞の持続が可能になる。免疫チェックポイント阻害を誘導する薬剤を使用して宿主エフェクター機能を刺激または活性化するために最近開発された戦略は、いくつかのがんの治療で成功を収めている。新たな証拠により、T細胞の枯渇がキメラ抗原受容体発現T細胞（CAR T細胞）による長寿命の抗腫瘍活性の持続における重大な障害となる可能性が示唆されている。CAR形質導入前の患者から採取したT細胞の分化状態、およびCAR T細胞を再導入する前に患者が受ける移植前処理（例えば、アルキル化剤、フルダラビン、全身照射の追加または排除）は、CAR-T細胞の持続性および細胞傷害能に大きく影響し得る。T細胞集団を（抗CD3/CD28または刺激細胞を介して）刺激し、（サイトカイン、例えばIL-2を介して）増大させるin vitro培養条件は、CAR T細胞の分化状態およびエフェクター機能も変化させ得る（Ghoneim et al., (2016) Trends in Molecular Medicine 22(12):1000-1011）。

30

40

【0276】

CAR発現免疫エフェクター細胞を製造する方法

本明細書に記載されるいずれかのCARを含む、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞のいずれかを生成させるために使用することができる方法が、本明細書において提供される。

【0277】

一部の実施形態では、対象の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）を、キメラ抗原受容体によって遺伝子改変する（Sadelain et al., Cancer Discov. 3:388-398, 2

50

013)。例えば、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）を用意し、キメラ抗原受容体をコードする組換え核酸を患者由来の免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）に導入して、CAR細胞を生成させる。一部の実施形態では、対象に由来しない免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）を、キメラ抗原受容体によって遺伝子改変する。例えば、一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）は、「既製の」養子細胞療法、例えば、Celllectis社によって開発されているユニバーサルキメラ抗原受容体T細胞（UCART）として使用されるように操作された同種細胞である。

【0278】

当技術分野で公知の種々の異なる方法を使用して、本明細書に記載されるCARをコードする核酸のいずれか、または本明細書に記載されるCARをコードする核酸を含む発現ベクターを、免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）に導入することができる。免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）に核酸を導入するための方法の非限定的な例としては、リポフェクション、トランスフェクション（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、高度分岐有機化合物を使用するトランスフェクション、カチオン性ポリマーを使用するトランスフェクション、デンドリマーに基づくトランスフェクション、光学的トランスフェクション、粒子に基づくトランスフェクション（例えば、ナノ粒子トランスフェクション）、またはリポソーム（例えば、カチオン性リポソーム）を使用するトランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、細胞圧搾、ソノポレーション、プロトプラスト融合、インパレフェクション、流体力学的送達、遺伝子銃、マグネトフェクション、ウイルストランスフェクション、およびヌクレオフェクションが挙げられる。さらに、当技術分野で公知のCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を使用して、CAR核酸を免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）に導入し、および/または他の遺伝子改変（例えば、下記のように）を免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）に導入して、CAR T細胞活性を増強することができる（CAR T細胞との関連におけるCRISPR/Cas9技術の使用については、例えば、米国特許第9,890,393号明細書；米国特許第9,855,297号明細書；米国特許出願公開第2017/0175128号明細書；米国特許出願公開第2016/0184362号明細書；米国特許出願公開第2016/0272999号明細書；国際公開第2015/161276号パンフレット；国際公開第2014/191128号パンフレット；中国特許第106755088号明細書；中国特許第106591363号明細書；中国特許第106480097号明細書；中国特許第106399375号明細書；中国特許第104894068号明細書を参照）。

【0279】

一部の態様では、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞を産生する方法は、(i)末梢血、臍帯血またはリンパ液から（例えば、末梢血単核細胞（PMBC）から）細胞を得るステップ、(ii)任意選択で、得られた細胞を精製するステップ、(iii)任意選択で、細胞を増大させるステップ、(iv)任意選択で、細胞を（例えば、抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片および/または抗CD28抗体もしくはその抗原結合断片により）活性化するステップ、(v)任意選択で、活性化された細胞を増大させるステップ、(vi)本明細書に記載されるCARを含む発現ベクターにより細胞に形質導入するステップ、(vii)CARを発現する細胞を単離するステップ、および(viii)任意選択で、単離された細胞を増大させるステップを含む。

【0280】

一部の態様では、本明細書に記載される免疫エフェクター細胞を作製するための方法は、(i)多能性幹細胞(iPSC)を得るステップ、(ii)iPSCを誘導して免疫エフェクター細胞に（例えば、NK細胞、マクロファージまたはT細胞（例えば、CD8⁺T細胞）に）分化させるステップ、(iii)任意選択で、免疫エフェクター細胞を増大させるステップ、(iv)本明細書に記載されるCARを含む発現ベクターにより免疫エフェクター細胞に形質導入するステップ、(v)CARを発現する免疫エフェクター細胞を単離するステップ、および(vi)任意選択で、単離された細胞を増大させるステップ

を含む。

【0281】

組成物

一態様では、本明細書に開示される抗体またはその抗原結合断片を含む組成物（例えば、医薬組成物）が、本明細書において提供される。医薬組成物中の抗体または断片は精製されていてもよい。

【0282】

一態様では、本明細書に開示される二重特異性分子（例えば、二重特異性抗体）を含む組成物（例えば、医薬組成物）が、本明細書において提供される。医薬組成物中の二重特異性分子は精製されていてもよい。

10

【0283】

一態様では、本明細書に開示されるいずれかの免疫エフェクター細胞（例えば、CARポリペプチド発現免疫エフェクター細胞）を含む組成物（例えば、医薬組成物）が、本明細書において提供される。

【0284】

医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。賦形剤および安定剤を含むがこれらに限定されない、適切な薬学的に許容される担体が、当技術分野で公知である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PAを参照）。

【0285】

医薬組成物は、好ましくは薬学的に許容される担体（例えば、本明細書において想定されるヒトまたは他の対象への投与のために好適な、1つまたは複数の適合性の固体もしくは液体充填剤、希釈剤または封入物質）の中に、細胞、係留手段（例えば、脂質ナノ粒子）および/またはタンパク質もしくはペプチドを含む無菌組成物であり得る。担体は、有機または無機成分、天然性または合成性、であり得、それが細胞、係留手段（例えば、脂質ナノ粒子）および/またはタンパク質もしくはペプチドと組み合わせられることで、投与が容易になる。医薬組成物の構成成分は、それらの所望の医薬効率を実質的に損なうと考えられる相互作用が起こらないような様式で混合される。

20

【0286】

薬学的に許容される担体としては、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、分散剤、等張剤、湿潤剤、キレート剤、封鎖剤、pH緩衝剤、溶解促進剤、抗菌剤、麻酔剤、および/または抗酸化剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0287】

医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤および組成物を調製するための手法は、当技術分野で公知である（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006を参照；これはその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。従来の賦形剤媒体の使用は、本開示の範囲内であると考えられるが、ただし、任意の従来の賦形剤媒体が、例えば、何らかの望ましくない生物学的効果を生じることによって、または別様に医薬組成物の他のいずれかの構成成分と有害な様式で相互作用することによって、物質またはその誘導體と不適合であり得る場合を除く。賦形剤としては、例えば、抗接着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、エモリエント、乳化剤、充填剤（希釈剤）、フィルム形成剤またはコーティング剤、滑剤（流動増強剤）、潤沢剤、保存剤、印刷用インク、吸着剤、懸濁剤または分散剤、甘味剤、および水和の水が挙げられる。例示的な賦形剤としては、食塩水、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、スクロース、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、麦芽、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン

40

50

、微結晶セルロース、ポリエチレングリコール、グリセロール、エタノール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、デンプン（例えば、アルファ化デンプン）、プロピレン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、シリカゲル、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、タルク、ベースクリーム、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、およびキシリトールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0288】

一部の実施形態では、本明細書に開示される薬学的組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容される塩を含み得る。本開示の組成物中に含まれ得る、薬学的に許容される塩の例としては、アミンなどの塩基性残基の酸付加塩、アルカリまたはアルカリ土類金属塩、鉍酸塩または有機酸塩；カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、酢酸、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサ酸塩、臭化水素塩、塩酸塩、ヨウ化水素塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどの他、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどを含むがこれらに限定されない非毒性アンモニウム、四級アンモニウム、およびアミンカチオンが挙げられる。

【0289】

医薬組成物は、対象（例えば、ヒト）への投与のために好適であるように製剤化することができる。医薬組成物は、任意の投与経路のために製剤化することができる。

【0290】

医薬組成物は、それを全身性に送達することが望ましい場合には、注射による、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために製剤化することができる。そのような製剤は、注射の前に溶液または懸濁液にするのに好適な液体溶液、懸濁液、エマルジョンまたは固体形態として調製することができる。注射用の製剤は、例えば、アンプルまたは複数回投与容器の中にある、単位剤形として用意することができる。非経口用の医薬製剤には、成分の水溶液が含まれる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘性を高める物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有することができる。あるいは、成分の懸濁液を、油性の懸濁液として調製することもできる。好適な親油性溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油、例えば、胡麻油、または合成脂肪酸エステル、例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、またはリポソームが挙げられる。非経口的に投与される場合、好適な薬学的に許容される担体としては、生理食塩水またはリン酸緩衝食塩水（PBS）、または、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはグルコースを含有する溶液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0291】

本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片、二重特異性分子またはCAR発現免疫エフェクター細胞は、治療有効量で使用されるか、または本明細書に開示される医薬組

10

20

30

40

50

成物中に治療有効量で存在することができる。治療有効量は、標準的な臨床手法によって決定することができる。

【0292】

本明細書において想定される薬学的に許容される組成物は、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片、二重特異性分子またはCAR発現免疫エフェクター細胞に加えて、追加の抗がん剤（例えば、本明細書に記載される任意の1つ、2つ、3つまたはそれ以上の抗がん剤）を含み得る。

【0293】

治療方法および使用

一態様では、本開示は、がんの治療を必要とする対象においてがんを治療する（例えば、がん増殖を抑制する、がん進行を抑制する）ための方法であって、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、NPM1c陽性がんを治療するための方法を提供する。本明細書で使用される場合、「NPM1c陽性がん」は、NPM1遺伝子に変異（例えば、NPM1における4nt重複変異）を有する腫瘍細胞を含むがんを指し、NPM1における変異は、野生型NPM1を発現する細胞と比較した場合に、NPM1タンパク質の細胞質局在の増加をもたらす。特定の遺伝子変異（例えば、NPM1における4nt重複変異）の存在を決定するために、がんにおける遺伝子発現を測定する方法は、当技術分野で公知であり、対象から収集した悪性腫瘍試料（例えば、血液、骨髄、腫瘍、および/または組織試料）の分析が含まれる。一部の態様では、遺伝子における小さな重複、挿入、または欠失を検出するための方法は、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、液滴デジタルPCR、Sangerシーケンシング、および次世代シーケンシング（例えば、全ゲノムシーケンシング、例えば、全エクソームシーケンシング）を使用して行われる。一部の態様では、NPM1c陽性がんは、NPM1遺伝子における変異（例えば、遺伝子のエクソン12における4塩基対フレームシフト挿入、代替的リーディングフレームにおけるC末端11アミノ酸をコードする変異、または以下のC末端アミノ酸配列：MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK（配列番号57）を含むタンパク質の発現をもたらすNPM1変異）を有することが検出される。一部の実施形態では、NPM1c陽性がんは、NPM1タンパク質の細胞質局在が増加した腫瘍細胞を含む。NPM1の細胞局在を評価する方法は当技術分野で公知であり、例えば、標識された抗NPM1抗体を使用し、顕微鏡検査またはフローサイトメトリーによって局在を評価する。一部の実施形態では、NPM1c陽性がんから単離された腫瘍細胞は、健全な非がん性組織試料から単離された細胞と比較した場合に、NPM1タンパク質の細胞質局在が増加している。

【0294】

一部の実施形態では、本開示は、NPM1c陽性がんの治療を必要とする対象においてNPM1c陽性がんを治療する（例えば、がんの増殖または進行を抑制する）ための方法であって、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載される二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0295】

一態様では、本開示は、AMLの治療を必要とする対象においてAMLを治療する（例えば、AMLの増殖または進行を抑制する）ための方法であって、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、患者はヌクレオフォスミン1遺伝子における変異を持つ。一部の実施形態では、AMLは、NPM1c陽性腫瘍細胞またはヌクレオフォスミン1

遺伝子における変異を発現する腫瘍細胞を含む。ある特定の実施形態では、本開示は、NPM1c陽性AMLの治療を提供する。

【0296】

ある特定の実施形態では、本開示の、抗体もしくはその抗原結合断片（例えば、scFv）、二重特異性分子、CARポリペプチド、CARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞、または医薬組成物を、がんを治療するための標的化免疫療法の開発に使用することができる。一部の実施形態では、がんはNPM1c陽性がんである。

【0297】

ある特定の実施形態では、本開示の、抗体もしくはその抗原結合断片（例えば、scFv）、二重特異性分子、CARポリペプチド、CARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞、または医薬組成物を、AMLの治療のために使用することができる。一部の実施形態では、AMLはNPM1c陽性である。

10

【0298】

ある特定の実施形態では、本開示の、抗体もしくはその抗原結合断片（例えば、scFv）、二重特異性分子、CARポリペプチド、CARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞、または医薬組成物を、AML細胞を殺滅するための細胞傷害性薬剤として使用することができる。一部の実施形態では、AML細胞、またはその亜集団は、NPM1c陽性である。

【0299】

一部の実施形態では、本開示は、HLA-A2をコードするアレル（すなわち、HLA-A*02:01アレル）を保有する対象においてNPM1c陽性がん（例えば、AML）を治療するための方法を提供する。一部の実施形態では、NPM1c陽性がん（例えば、AML）は、HLA-A2の発現を有する腫瘍細胞を含む。HLA発現を決定する方法は当技術分野で公知であり、HLA-A2を認識する標識抗体を使用するフローサイトメトリー、免疫組織化学、およびウエスタンブロット法が含まれる。HLA発現を、RT-PCRおよびRNAシーケンシングによって決定することもできる。

20

【0300】

ある特定の実施形態では、本開示は、がん（例えば、NPM1c陽性がん、例えば、AML）の治療を必要とする対象におけるがんの治療であって、がんを含む細胞の細胞表面が、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示し、治療が、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む、治療を提供する。

30

【0301】

ある特定の実施形態では、本開示は、がん（例えば、NPM1c陽性がん、例えば、AML）の治療を必要とする対象におけるがんの治療であって、がんを含む細胞の細胞表面が、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2、またはHLA-A*02アレルグループによってコードされるタンパク質、例えば、HLA-A*02:01アレルによってコードされるタンパク質）と複合体を形成したAIQDLC LAV（配列番号1）ネオエピトープを提示し、治療が、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む、治療を提供する。

40

【0302】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む、がん（例えば、がんはNPM1c陽性であり、例えば、がんはAMLである）を有する対象におけるがんの量の減少、ま

50

たは生存期間の延長を提供する。ある特定の実施形態では、がんを含む細胞の細胞表面は、MHCクラスIタンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープ（例えば、配列番号1）を提示する。

【0303】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む、がんから寛解している対象におけるがんの予防を提供する。

【0304】

一実施形態では、がんは再発がんである。一実施形態では、がんは難治性がんである。一実施形態では、がんは進行期がんである。一実施形態では、がんは、1つまたは複数の他の治療法（例えば、化学療法、放射線療法、幹細胞移植、または別の免疫療法）に対して抵抗性である。

【0305】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるいずれかの抗体もしくは抗原結合断片、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含むいずれかの免疫エフェクター細胞、または本明細書に記載されるいずれかの医薬組成物を対象に投与するステップを含む、AMLの予防を必要とする対象におけるAMLの予防を提供する。一実施形態では、本開示は、AMLから寛解している

【0306】

ある特定の実施形態では、治療しようとするがんはAMLである。一部の実施形態では、がんは再発性AMLである。一部の実施形態では、がんは難治性AMLである。一部の実施形態では、がんは進行AMLである。一実施形態では、がんは、1つまたは複数の他の治療法（例えば、化学療法、放射線療法、幹細胞移植、または別の免疫療法）に対して抵抗性であるAMLである。

【0307】

本明細書に記載される任意の治療法の有効性は、（例えば、治療される対象または治療されるがんの動物モデルへの）治療法の前後のパラメーター（例えば、腫瘍量）を評価することによって評価することができる。当技術分野で公知の任意のアッセイを使用して、本明細書に記載される治療法の治療有効性を評価することができる。

【0308】

投与の方法

本明細書に記載される治療法は、非経口的な投与経路を含むがこれに限定されない任意の好適な手段によって対象に投与することができる。一部の実施形態では、組成物は、患者に非経口的に投与される。非経口的投与の好適な経路の非限定的な例としては、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、腫瘍内、髄腔内および腹腔内投与が挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、静脈内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、腹腔内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、筋肉内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、皮下に投与される。ある特定の実施形態では、投与は、静脈内、髄腔内、骨内または脊髄内である。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、脊髄内または脊柱管内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、髄腔内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、骨内に投与される。一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、骨髄内に投与される。

【0309】

適切な投与量は、治療される特定のがん、治療される対象の年齢、体重および身体状態、がんの重症度、投与の経路、治療の期間、治療される対象の反応性、同時または併用療法の性質（もしあれば）、具体的な投与経路、ならびに医療従事者の知識および専門知識

10

20

30

40

50

の範囲にある同様の要因によって異なると考えられる。ある特定の実施形態では、最大耐量、すなわち、堅実な医学的判断による最大の安全用量が使用されるべきである。好ましい態様では、治療法は、有効量で投与されるべきである。有効量は、医学的に望ましい結果を提供するのに十分な組成物の投与量である。

【0310】

例えば、対象が腫瘍を有する場合、有効量は、（例えば、腫瘍を画像化することによって決定される）腫瘍体積または負荷を減少させる量であり得る。有効量を、血液または他の体液もしくは組織（例えば、生検試料）中のがん細胞の存在および/または頻度によって評価してもよい。腫瘍が組織または臓器の正常な機能に影響を及ぼしている場合、有効量は、組織または臓器の正常な機能を測定することによって評価することができる。

10

【0311】

ある特定の実施形態では、CAR発現免疫エフェクター細胞は、約または少なくとも 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、または 5×10^{11} 、 1×10^{11} 、または 5×10^{12} 個（またはその間の任意の値もしくは範囲）の量で投与される。

【0312】

単回投与またはある期間にわたる複数回投与を含む、本明細書に記載される治療法のような投薬スケジュールが想定されている。投与の方法には、ポラス投与および注入（例えば、連続注入またはパルス注入）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0313】

本明細書に記載される方法に使用するための治療レジメンとしては、1週間に2回、毎週1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、1か月間もしくは4週間ごとに1回、6週間ごとに1回、2か月間もしくは8週間ごとに1回、または3か月間もしくは12週間ごとに1回の治療法の投与を挙げることができる。ある特定の実施形態では、対象は、本明細書に記載されるいずれかの治療法の単回の用量を投与される。ある特定の実施形態では、対象は、本明細書に記載されるいずれかの治療法の少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも8回、または少なくとも10回の用量を投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される治療法は、毎日、1日おきに、または1週間に2回投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される治療法は、ある期間、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、または1年間にわたり投与される。

30

【0314】

一部の実施形態では、最初の治療期間（治療法が、例えば、単回、1週間に2回、1週間に1回、2週間に2回、または1か月間に1回投与される）に続いて、抗体が投与されない休薬期間（例えば、1週間、2週間、3週間、1か月間もしくは4週間、6週間、2か月間もしくは8週間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、または1年間にわたる）があり、次いで、第2の治療期間（治療法が、例えば、単回、1週間に2回、1週間に1回、2週間に2回、または1か月間に1回投与される）がある。そのような最初の治療期間およびそのような第2の治療期間は、例えば、2週間、3週間、4週間、6週間、2か月間、または3か月間継続され得る（最初の治療期間は第2の治療期間と同じであってもよく、または異なってもよい）。

40

【0315】

患者集団

本明細書に記載される方法に従って治療される対象としては、ヒトおよび非ヒト脊椎動物が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法に従って治療される対象は、哺乳動物、例えば、家飼いペット（例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレットなど）、家畜または農業動物（例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリまたは別の家禽）、ウマ（例えば、純血種のウマ）、サル、実験動

50

物（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）その他である。対象にはまた、魚類および他の水生動物種も含まれる。好ましい一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って治療される対象はヒトである。一実施形態では、本開示は、急性骨髄性白血病（AML）の治療のための標的化免疫療法によって利益を得る可能性が高いと考えられるあらゆる対象において実施することができる。一部の実施形態では、本開示は、NPM1c陽性がん（例えば、AML）を有する対象における使用のためのものである。

【0316】

一部の態様では、本開示の治療方法および使用は、本明細書に記載されるいずれかの免疫療法から利益を得ることができる（またはその可能性が高い）がんを有する（例えば、それを有すると診断された）任意の対象において実施することができる。がん（例えば、NPM1c陽性がん、例えば、AML）を有する対象は、検出可能ながん細胞を有する対象である。本開示は、がん（例えば、NPM1c陽性がん、例えば、AML）を有する対象に対する、本明細書に記載されるいずれかの抗体またはその抗原結合断片（例えば、scFv）、本明細書に記載されるいずれかの二重特異性分子、および本明細書に記載されるCARポリペプチドを発現するいずれかの免疫エフェクター細胞の投与を想定している。

10

【0317】

一部の態様では、本開示の治療方法および使用は、NPM1遺伝子における変異（例えば、遺伝子のエクソン12における4塩基対フレームシフト挿入、代替的リーディングフレームにおけるC末端11アミノ酸をコードする変異、または以下のC末端アミノ酸配列：MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK（配列番号57）を含むタンパク質の発現をもたらすNPM1変異）によって特徴付けられる（例えば、それを有することが知られている、有することが予想される、または有することが検出された）がんを有する、任意の対象において実施することができる。ある特定の実施形態では、本開示の治療方法および使用は、変異型NPM1タンパク質（例えば、細胞質局在を有するNPM1c変異型タンパク質、C末端ドメインにおける変異を有するタンパク質、フォールディングしたC末端ドメインを欠く変異型タンパク質、以下のC末端アミノ酸配列：MTDQEAIQDLC LAVEEVSLRK（配列番号57）を含むタンパク質、配列番号56によって示されるタンパク質、またはNPM1c）の発現によって特徴付けられる（例えば、発現することが知られている、発現することが予想される、または発現することが検出された）がんを有する、任意の対象において実施することができる。NPM1cの変異したC末端配列は当技術分野で公知である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、van der Lee et al., 2019, J. Clin. Invest. 129(2):774-785を参照。例えば、図1を参照）。一部の態様では、本開示の治療方法および使用は、がんを有する任意の対象において実施することができ、そのがんを含む細胞の細胞表面は、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成した変異型ヌクレオフォスミンネオエピトープ（例えば、NPM1cネオエピトープ、例えば、AIQDLC LA V（配列番号1））を提示する（例えば、提示することが知られている、提示することが予想される、または提示することが検出された）。一部の態様では、本開示の治療方法および使用は、がんを有する任意の対象において実施することができ、クラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）は、そのがんを含む細胞の細胞表面に、NPM1cネオエピトープ（例えば、AIQDLC LA V（配列番号1））を提示するかまたは呈する。

20

30

40

【0318】

任意選択で、本明細書に記載される方法に従って治療される予定の見込みのある患者のがん細胞が、NPM1遺伝子もしくはNPM1タンパク質における変異について検査され、またはがんを含む細胞の細胞表面がクラスI主要組織適合複合体（MHCクラスI）タンパク質（例えば、HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープ（例えば、AIQDLC LA V（配列番号1））を含む抗原を提示するか否かを決定するために検査される。一部の態様では、そのような検査が、NPM1遺伝子における変異もしくはは

50

NPM1タンパク質における変異に関して陽性である場合、またはクラスI主要組織適合複合体(MHCクラスI)タンパク質(例えば、HLA-A2)と複合体を形成したNPM1cネオエピトープ(例えば、AIQDLCLAV(配列番号1))を含む抗原をがん細胞の細胞表面に提示していると決定された場合には、患者は、本明細書に記載される方法に従って治療される。

【0319】

一部の態様では、本開示の治療方法および使用は、急性骨髄性白血病(AML)を有する対象において実施することができる。特定の一実施形態では、本開示の治療方法および使用は、AMLと診断された対象において実施される。

【0320】

本明細書に記載される方法によって治療されるがんを診断するための検査は、当技術分野で公知であり、通常の医療従事者には熟知されていると考えられる。これらの臨床検査には、顕微鏡分析、培養依存性検査(培養など)、および核酸検出検査が挙げられるが、これらに限定されない。これらには、湿式マウント、染色増強顕微鏡検査、免疫顕微鏡検査(例えば、FISH)、ハイブリダイゼーション顕微鏡検査、粒子凝集、酵素結合免疫吸着検定法、尿スクリーニング検査、DNAプローブハイブリダイゼーション、血清学的検査などが含まれる。医師は一般に、以上に列挙した臨床検査を実行することに加えて、全病歴を聴取し、完全な身体診察を行う。

【0321】

AMLの検出のための方法には、白血病細胞に関するPBMCのフローサイトメトリーと、それに続くNPM1c変異に関するPCRおよび配列決定が含まれるが、これらに限定されない。AML診断のための臨床的方法は当技術分野で公知である。AML発症の危険因子には、喫煙、化学療法、放射線療法、特定の血液疾患、および加齢が含まれる。

【0322】

一実施形態では、治療される対象は、早期がん(例えば、AML)と診断されている。
一実施形態では、治療される対象は、進行期がん(例えば、AML)と診断されている。

【0323】

一部の実施形態では、治療される対象は、AML進行のいずれかの段階にある。

【0324】

一部の態様では、治療される対象は、以前に1つまたは複数の他のがん治療(例えば、化学療法、放射線療法、または幹細胞移植)を受けている。ある特定の実施形態では、治療される対象は、以前に1つまたは複数の他のがん治療(例えば、化学療法、放射線療法、または幹細胞移植)を受けており、対象のがんが再発している。ある特定の実施形態では、治療される対象は、以前に1つまたは複数の他のがん治療(例えば、化学療法、放射線療法、または幹細胞移植)を受けており、対象は、1つまたは複数の他のがん治療に対して抵抗性を生じている。ある特定の実施形態では、治療される対象は、寛解状態にある(例えば、がんの部分寛解または完全寛解にある)。ある特定の実施形態では、治療される対象は、1つまたは複数の他のがん治療(例えば、化学療法、放射線療法、または幹細胞移植)に対して難治性である。

【0325】

他の実施形態では、本開示の治療方法および使用に従って、本明細書に記載されるいくつかの免疫療法から利益を得ることができる(または得られる可能性が高い)がんを発症するリスクのある対象を治療することが、本明細書において想定される。がん(例えば、AML)を発症するリスクのある対象は、がんを発症する確率が通常よりも高い対象である。これらの対象には、例えば、がんを発症する可能性の高さと関連することが実証されている遺伝子異常を有する対象、がんの家族性素因を有する対象、タバコ、アスベスト、または他の毒性化学物質などのがん原因物質(すなわち、発がん物質)に曝露された対象、およびがんの治療歴があって見かけ上は寛解状態にある対象が含まれる。本開示は、がん(例えば、AML)を発症するリスクのある対象への、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片(例えば、scFv)、本明細書に記載される二重特異性分子、およ

10

20

30

40

50

び本明細書に記載されるCARポリペプチドを発現する免疫エフェクター細胞の投与を想定している。

【0326】

一実施形態では、治療される対象は成人である。一実施形態では、対象は、18歳以上のヒト対象である。一実施形態では、対象は、21歳以上のヒト対象である。一実施形態では、対象は、45歳以上のヒト対象である。一実施形態では、対象は、65歳以上のヒト対象である。一実施形態では、対象は、18歳未満のヒト対象である。一実施形態では、対象は、45歳未満（または18歳から45歳の間、もしくは21歳から45歳の間）のヒト対象である。一実施形態では、対象は、65歳未満（または18歳から65歳の間、21歳から65歳の間、もしくは45歳から65歳の間）のヒト対象である。

10

【0327】

併用療法

一部の態様では、本明細書に記載される治療方法および使用は、治療応答を増強する、例えば、対象における抗腫瘍応答を増強する、および/または腫瘍に対して細胞傷害性である（例えば、化学療法剤）、追加の薬剤による対象の治療をさらに含む。

【0328】

一部の態様では、本明細書に記載される治療法は、1つまたは複数の抗がん療法、例えば、化学療法、放射線療法、幹細胞移植、抗がん活性を有する小分子、別の抗がん免疫療法（例えば、別の抗がん抗体もしくはその断片、または別のT細胞療法）、または当技術分野で公知の任意の他の抗がん療法と組み合わせて、対象に投与される。

20

【0329】

一部の態様では、本明細書に記載される、抗体、抗原結合抗体断片、二重特異性分子、またはそれを含む組成物のうちの1つまたは複数は、1つまたは複数の抗がん療法、例えば、化学療法、放射線療法、幹細胞移植、抗がん活性を有する小分子、別の抗がん免疫療法（例えば、別の抗がん抗体もしくはその断片、または別のT細胞療法）、または当技術分野で公知の任意の他の抗がん療法と組み合わせて、対象に投与される。

【0330】

一部の態様では、本明細書に記載される、CAR発現免疫エフェクター細胞、またはそれを含む組成物のうちの1つまたは複数は、幹細胞移植または別の抗がん免疫療法（例えば、別の抗がん抗体もしくはその断片、または別のT細胞療法）と組み合わせて、対象に投与される。CARを含む免疫エフェクター細胞による投与については、免疫エフェクター細胞の生存性に負の影響を及ぼさないと考えられるいずれかの併用療法が、本明細書において想定される。

30

【0331】

併用療法における使用のために好適な治療薬には、プロテインチロシンキナーゼ阻害剤を含む小分子化学療法薬、ならびに以下でさらに考察するものを含むがこれらに限定されない生物学的抗がん剤、例えば、抗がん抗体が含まれる。

【0332】

一部の態様では、併用療法は、抗腫瘍免疫を増強するための免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、PD-L2阻害剤、またはCTLA-4阻害剤を、対象に投与するステップを含む。免疫チェックポイントの他のモジュレーターは、TIM-3、OX-40、OX-40LまたはICOSを標的とすることができる。一実施形態では、免疫チェックポイントを調節する薬剤は、抗体（例えば、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3またはOX-40に対する拮抗抗体）である。別の実施形態では、免疫チェックポイントを調節する薬剤は、タンパク質モジュレーターまたは低分子モジュレーターである。別の実施形態では、薬剤（例えば、mRNA）は、免疫チェックポイントの抗体モジュレーターをコードする。一実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法が、TIM-3阻害剤と組み合わせて投与される。一実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法が、PD-1阻害剤と組み合わせて投与される。一実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法が、PD-

40

50

L 1 阻害剤と組み合わせて投与される。一実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法が、CTLA-4 阻害剤と組み合わせて投与される。併用療法に使用することができる免疫チェックポイント阻害剤の非限定的な例としては、ベムプロリズマブ、アレムツズマブ、ニボルマブ、ピジリズマブ、オフアツムマブ、リツキシマブ、MED10680、PDR001、AMP-224、PF-06801591、BGB-A317、REGN2810、SHR-1210、TSR-042、アフィマー、アベルマブ(MSB0010718C)、アテゾリズマブ(MPDL3280A)、デュルバルマブ(MEDI4736)、BMS936559、イピリムマブ、トレメリムマブ、AGEN1884、MEDI6469およびMOXR0916が挙げられる。

【0333】

特定の一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、化学療法と組み合わせて対象に投与される。本明細書に記載される併用療法に使用することができる化学療法薬の種類例としては、アルキル化剤、ニトロソ尿素剤、代謝拮抗剤、白金錯体誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤、アロマターゼ阻害剤、植物由来のアルカロイド、ホルモン拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、およびP糖タンパク質阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される併用療法に使用することができる化学療法薬の具体的な例としては、タキソール、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、5-フルオロウラシル(5-FU)、ゲムシタピン、ドキシルピシン、ダウノルピシン、コルヒチン、ミトキサントロン、タモキシフェン、シクロホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ウラムスチン、ムスタルゲン、イホスファミド、ベンダムスチン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、フォテムスチン、ストレプトゾシン、チオテパ、マイトマイシン、ジアジクオン、テトラジン、アルトレタミン、ダカルバジン、ミトゾロミド、テモゾロミド、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、アルトレタミン、ヘキサレン、トロホスファミド、エストラムスチン、トレオスルファン、マンノスルファン、トリアジクオン、カルボクオン、ニムスチン、ラニムスチン、アザチオプリン、スルファニラミド、フルオロピリミジン、チオプリン、チオグアニン、メルカプトプリン、クラドリピン、カペシタピン、ペメトレキセド、フルダラビン、メトトレキサート、ヒドロキシ尿素、ネララビンまたはクロファラビン、シタラビン、デシタピン、プララトレキサート、フロクスウリジン、チオグアニン、アザシチジン、クラドリピン、ペントスタチン、メルカプトプリン、イマチニブ、ダクチノマイシン、セルピジン、プレオマイシン、アクチノマイシン、ルテオマイシン、エピルピシン、イダルピシン、プリカマイシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンデシン、ピンフルニン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、テニポシド、ペリウインクル、ピンカ、タキサン、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、テニポシド、ピラルピシン、ノボピオシン、メルパロン、アクラルピシン、アムサクリン、抗アンドロゲン薬、抗エストロゲン薬、ピカルタミド、メドロキシプロゲステロン、フルオキシメステロン、ジエチルスチルベストロール、エストラス、オクトレオチド、メゲストロール、ラロキシフェン、トレミフェン、フルベストラント、プレドニゾン、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン、アミノグルテチミド、テストラクトン、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、ボロゾール、フォルメスタン、ファドロゾール、アンドロステン、レスベラトロール、ミオスミン、カテキン、アピゲニンエリオジクチオールイソリキリチゲニン、マンゴスチン、アミオダロン、アジスロマイシン、カプトプリル、クラリスロマイシン、シクロスポリン、ピペリン、ケルセチン、キニジン、キニン、レセルピン、リトナビル、タリキダル、ベラパミル、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、トランスプラチン、ネダプラチン、サトラプラチン、トリプラチンおよびカルボプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0334】

特定の一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、AMLの治療のための1つまたは複数の化学療法と組み合わせて、対象に投与される。一部の実施形態では、1つまたは複数の化学療法は、シタラビン、ダウノルピシン、イダルピシン、クラドリピン、フル

10

20

30

40

50

ダラビン、ミトキサントロン、エトポシド、6 - チオグアニン、ヒドロキシ尿素、プレドニゾン、デキサメタゾン、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、アザシチジン、およびデシタビンから選択される。

【0335】

特定の一実施形態では、本明細書に記載される治療法は、放射線療法と組み合わせて対象に投与される。

【0336】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法は、幹細胞移植と組み合わせて対象に投与される。

【0337】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの治療法は、1つまたは複数の追加の抗がん治療の前、その間（すなわち、同時に）またはその後投与することができる。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って治療される対象は、以前に抗がん治療を受けていない。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って治療される対象は、以前に抗がん療法（例えば、化学療法、放射線療法、または幹細胞移植）を受けている。

【0338】

診断用途

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗体断片組成物は、診断用途に使用される。例えば、本明細書に記載される標識抗体または抗原結合断片は、試料（例えば、生体試料）における標的抗原（例えば、NPM1c : HLA - A2）の存在または量を検出するためのアッセイに使用される。別の例では、標的抗原（例えば、MHC I、例えば、NPM1c : HLA - A2と複合体を形成したNPM1cネオエピトープ）に結合する本明細書に記載される標識抗体または抗原結合断片は、標的抗原に結合する追加の化合物（例えば、小分子、アダプター、または抗体）を同定するために陽性対照として使用される。

【0339】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗体断片組成物は、例えば、フローサイトメトリーまたは顕微鏡検査によって、MHC I（例えば、NPM1c : HLA - A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを提示する細胞を特徴付けるかまたは同定するための *in vitro* アッセイに使用される。例えば、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片組成物がMHC I（例えば、NPM1c : HLA - A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープに結合する一部の実施形態では、組成物は、試料（例えば、生体試料）における標的抗原を提示する細胞を同定するために使用される。したがって、本明細書に記載される抗体、またはその抗原結合断片は、患者における疾患（例えば、がん、例えば、NPM1遺伝子における変異を有するがん、例えば、NPM1遺伝子における変異を有するAML）を診断するため、予後判定のため、および/またはその進行を判定するために使用される。

【0340】

キット

一態様では、(i)本明細書に記載される抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載される二重特異性分子、本明細書に記載されるCARポリペプチド、本明細書に記載されるCARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）、または本明細書に記載される医薬組成物；(ii)任意選択で、1つまたは複数の追加の抗がん剤（例えば、化学療法薬）、および(iii)任意選択で、対象におけるがんの治療に使用するための説明書を含む1つまたは複数の容器を含むキットが、本明細書において提供される。

【0341】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるMHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c : HLA - A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを

10

20

30

40

50

含む抗原に結合する抗体またはその抗原結合断片、および使用のための説明書を含むキットに関する。キットは、本明細書に開示されるMHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に結合する単鎖可変抗体断片（scFv）、および使用のための説明書を含み得る。ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるMHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に結合するキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチド、および使用のための説明書を含むキットに関する。ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原および第2の抗原（例えば、CD3）に結合する二重特異性分子、ならびに使用のための説明書を含むキットに関する。

10

【0342】

一実施形態では、キットは、同一または別々の好適な容器内に、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に結合する抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液）とを含み得る。一実施形態では、キットは、同一または別々の好適な容器内に、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に結合する単鎖可変抗体断片（scFv）と、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液）とを含み得る。一実施形態では、キットは、同一または別々の好適な容器内に、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原および第2の抗原（例えば、CD3）に結合する二重特異性分子と、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液）とを含み得る。一実施形態では、キットは、同一または別々の好適な容器内に、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原に結合するキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチドと、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液）とを含み得る。一実施形態では、キットは、同一または別々の好適な容器内に、MHCクラスIタンパク質（例えば、NPM1c：HLA-A2）と複合体を形成したNPM1cネオエピトープを含む抗原および第2の抗原（例えば、CD3）に結合するCARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞と、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液）とを含み得る。

20

30

【0343】

好適な容器としては、限定はされないが、バイアル、ウェル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、注入バッグ、または他の容器手段を挙げることができ、その中に、本明細書に記載される抗体もしくはその抗原結合断片（例えば、scFv）、本明細書に記載される二重特異性分子、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチド、または本明細書に記載されるCARポリペプチドを含む免疫エフェクター細胞を収めることができる（場合によっては、好適に分割されている）。追加の構成成分が用意される場合、キットは、この構成成分を収めることができる追加の容器を含むことができる。容器は、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器をさらに含んでもよい。容器および/またはキットは、使用上の指示および/または警告を記載したラベルを含むことができる。

40

【0344】

以下の実施例は、説明のために提供され、限定としては提供されない。本発明の様々な他の実施形態は、本明細書において提供される一般的な説明を前提として、実施することができる。

【0345】

定義

本明細書で使用される場合、「NPM1c」という用語は、NPM1遺伝子における4ヌクレオチド重複に起因し、細胞質局在を有する、変異型ヌクレオフォスミンタンパク質（NPM1）を指す。野生型NPM1遺伝子によってコードされるヒトヌクレオフォスミ

50

ンは、配列番号54によって示されるアミノ酸配列(受託番号NM__002520)を有する。4ヌクレオチド重複を有するNPM1遺伝子によってコードされる例示的なNPM1cタンパク質は、配列番号56によって示されるアミノ酸配列を含む。さらに、前記例示的なNPM1cタンパク質のC末端アミノ酸配列は、MTDQEAIQDLC LAVEEVS LRK(配列番号57)を含み、これは、太字で強調表示されている、野生型ヌクレオフォスミンタンパク質に比して変異している配列の部分を含む(例えば、van der Lee et al., 2019, JCI 129(2):774-785; Verhaak, R. et al (2005) Blood 106:3747を参照)。一部の実施形態では、本開示のNPM1cネオエピトープは、アミノ酸配列MTDQEAIQDLC LAVEEVS LRK(配列番号57)を含むNPM1cタンパク質に由来するネオエピトープを含む。一部の実施形態では、本開示のNPM1cネオエピトープは、MTDQEAIQDLC LAVEEVS LRK(配列番号57)を含むアミノ酸配列を有するNPM1cの部分に由来するネオエピトープを含む。

10

【0346】

本明細書で使用される場合、「NPM1c:HLA-A2」という用語は、HLA-A2タンパク質と複合体を形成したNPM1cのネオエピトープを指す。一部の実施形態では、NPM1cのネオエピトープは、アミノ酸配列A IQDLC LA V(配列番号1)を含む。

【0347】

本明細書で使用される場合、用語「YG1」または「YG1 scFv」は、可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)がそれぞれ配列番号5および3によって示されるアミノ酸配列を有する、配列番号2によって示される完全長アミノ酸配列を含む例示的なscFvを指す。

20

【0348】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、数値を改変して使用される場合、その数値の最大で上下10%の偏差が、列挙された値の意図される意味の範囲内にあることを示す。

【0349】

本明細書で使用される場合、「VH」または「V_H」という用語は、抗体の重鎖可変領域を指す。

【0350】

本明細書で使用される場合、「VL」または「V_L」という用語は、抗体の軽鎖可変領域を指す。

30

【0351】

本明細書で使用される場合、参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」または「パーセント配列同一性」という用語は、配列のアラインメントを行い、最大のパーセント配列同一性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後に、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当技術分野で公知の様々な方法で、例えば、公開されているコンピュータソフトウェア、例えば、BLASTp、BLAST-2、ALIGN(例えば、ALIGN-2)またはMegalign(DNA STAR)ソフトウェアを使用して、達成することができる。比較の目的のためのギャップありアラインメントを得るためには、Gapped BLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されているように利用することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で入手可能)内のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch(J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))のアルゴリズムを、BlOSSum 6.2マトリックスまたはPAM 250マトリックスのいずれか、16、14、12、10、8、6、または4のギャップ加重、および1、2、3、4、5、または6の長さ加重で使用して、決定することができる。

40

50

【0352】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、一般に、2つの軽鎖ポリペプチドおよび2つの重鎖ポリペプチドを含む抗体を指す（この用語が使用される文脈が別のものを示唆する場合を除く）。抗体には、IgM、IgG、IgA、IgD、およびIgE抗体を含む異なる抗体アイソタイプが含まれる。「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ化抗体またはキメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体、および完全ヒト抗体を含む。抗体は、種々の種、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、オランウータン、ヒヒ、またはチンパンジー）、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、スナネズミ、ハムスター、ラット、およびマウスのいずれかにおいて作られるか、またはそれらに由来し得る。抗体は、精製された抗体または組換え抗体であることができる。

10

【0353】

本明細書で使用される場合、「抗体断片」、「抗原結合断片」という用語、または類似の用語は、標的抗原に結合する能力を保持している抗体の断片を指す。そのような断片には、例えば、単鎖抗体、単鎖Fv断片(scFv)、Fab断片、Fab'断片、またはF(ab')₂断片が含まれる。この用語には、例えば、単ドメイン抗体、例えば、ラクダ単ドメイン抗体も含まれる。例えば、Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem Sci 26:230-235; Nuttall et al. (2000) Curr Pharm Biotech 1:253-263; Reichmann et al. (1999) J Immunol Meth 231:25-38; PCT出願国際公開第94/04678号パンフレットおよび国際公開第94/25591号パンフレット; ならびに米国特許第6,005,079号明細書を参照されたく、これらはすべて、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本開示は、単ドメイン抗体が形成されるような改変を有する2つのVHドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。加えて、イントラボディ、ミニボディ、トリボディ、およびダイアボディも、抗体断片の定義に含まれ、本明細書に記載される方法における使用に適合する。例えば、Todorovska et al. (2001) J Immunol Methods 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) J Immunol Methods 231(1):177-189; Poljak (1994) Structure 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco (1997) Annual Review of Microbiology 51:257-283を参照されたく、それぞれの開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

【0354】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸置換」または「置換された」という用語（そのような用語が置換されたアミノ酸と称される場合）は、所定のアミノ酸配列における少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の、異なるアミノ酸残基による置き換えを指す。「アミノ酸挿入」という用語は、少なくとも1つの追加のアミノ酸の、所定のアミノ酸配列への組み入れを指す。挿入は通常、1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるが、より大きな「ペプチド挿入」を行うこともできる。置換または挿入されたアミノ酸残基は、天然に存在するものであってもよく、天然に存在しないもの（改変されたもの）であってもよい。「アミノ酸欠失」という用語は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

40

【0355】

本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、これには以下のものが含まれる：

- (1) 疎水性側鎖：Norleucine、Met、Ala、Val、Leu；
- (2) 中性親水性側鎖：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性側鎖：Asp、Glu；
- (4) 塩基性側鎖：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響する側鎖：Gly、Pro；および
- (6) 芳香族側鎖：Trp、Tyr、Phe。

50

【0356】

例えば、非保存的アミノ酸置換は、実質的に異なる側鎖（すなわち、異なるファミリーのメンバーであるアミノ酸残基）を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換である。

【0357】

一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基のハイドロパシー指数を考慮することによって行われる。各アミノ酸に、その疎水性および電荷特性に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている。それらは以下の通りである：I l e (+ 4 . 5) ; V a l (+ 4 . 2) ; L e u (+ 3 . 8) ; P h e (+ 2 . 8) ; C y s (+ 2 . 5) ; M e t (+ 1 . 9) ; A l a (+ 1 . 8) ; G l y (- 0 . 4) ; T h r (- 0 . 7) ; S e r (- 0 . 8) ; T r p (- 0 . 9) ; T y r (- 1 . 3) ; P r o (- 1 . 6) ; H i s (- 3 . 2) ; G l u (- 3 . 5) ; G l n (- 3 . 5) ; A s p (- 3 . 5) ; A s n (- 3 . 5) ; L y s (- 3 . 9) ; および A r g (- 4 . 5) 。ポリペプチドに相互作用機能を付与する上でのハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野で理解されている（例えば、Kyte et al (1982) J Mol Biol 157:105-131を参照）。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、1つのアミノ酸残基を、同一または類似の（例えば、約+2、+1.5、+1、+0.5、-0.5、-1、-1.5、または-2以内）ハイドロパシー指数を有する別のアミノ酸残基で置き換えることによって行われる。

【0358】

一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基の親水性を考慮することによって行われる。以下の親水性値が割り当てられている：A r g (+ 3 . 0) ; L y s (+ 3 . 0 ± 1) ; A s p (+ 3 . 0 ± 1) ; G l u t (+ 0 . 2) ; G l y (0) ; T h r (- 0 . 4) ; P r o (- 0 . 5 ± 1) ; A l a (- 0 . 5) ; H i s (- 0 . 5) ; C y s (- 1 . 0) ; M e t (- 1 . 3) ; V a l (- 1 . 5) ; L e u (- 1 . 8) ; I l e (- 1 . 8) ; T y r (- 2 . 3) ; P h e (- 2 . 5) ; および T r p (- 3 . 4) 。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、1つのアミノ酸残基を、同一または類似の（例えば、約+2、+1.5、+1、+0.5、-0.5、-1、-1.5、または-2以内）親水性を有する別のアミノ酸残基で置き換えることによって行われる。

【0359】

例示的なアミノ酸置換は表2に示されている。

【0360】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2: 保存的アミノ酸置換

| 元の残基 | 例示的な置換 | 好ましい置換 |
|------|------------------------------|--------|
| Ala | Val, Leu, Ile | Val |
| Arg | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn | Gln | Gln |
| Asp | Gln | Glu |
| Cys | Ser, Ala | Ser |
| Gln | Asn | Asn |
| Glu | Asp | Asp |
| Gly | Pro, Ala | Ala |
| His | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile | Leu, Val, Met, Ala, Phe, Nle | Leu |
| Leu | Nle, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile |
| Lys | Arg, Dbu, Gln, Asn | Arg |
| Met | Leu, Phe, Ile | Leu |
| Phe | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr | Leu |
| Pro | Ala | Gly |
| Ser | Thr, Ala, Cys | Thr |
| Thr | Ser | Ser |
| Trp | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Nle | Leu |

Nle = ノルロイシン

Dbu = 2,4-ジアミノ酪酸

10

20

【0361】

本明細書で使用される場合、「単離された抗体」という用語は、その天然環境の構成要素から分離されている抗体を指す。単離された抗体は、典型的には、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まない。単離された抗体は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない（例えば、NMP1c:HLA-A2に特異的に結合する単離された抗体は、NMP1c:HLA-A2以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。

30

【0362】

本明細書で使用される場合、「単離された核酸分子」という用語は、その自然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸分子は、その天然の染色体位置とは異なる位置に存在する。

【0363】

本明細書で使用される場合、「ネオエピトープ」は、疾患特異的変異によって生じるペプチドを含む疾患特異的抗原を指し、これは自己とは異なるものとして認識され、正常細胞ではなく、疾患によって影響を受けた細胞の表面上に提示される。「腫瘍ネオエピトープ」または「がんネオエピトープ」という用語は、腫瘍特異的またはがん特異的変異から生じるペプチドを含む腫瘍特異的またはがん特異的抗原を指し、これは自己とは異なるものとして認識され、正常細胞ではなく、腫瘍/がん細胞の表面上に提示される。腫瘍特異的またはがん特異的ネオエピトープの提示は、腫瘍細胞内での腫瘍特異的またはがん特異的抗原の細胞内プロセッシングおよび切断の後に生じ、それによって、腫瘍特異的またはがん特異的変異を含む8~15アミノ酸の1つまたは複数の異なるペプチドが生成される。それぞれCD8+ T細胞またはCD4+ T細胞への提示のためにMHCクラスI分子またはクラスII分子に結合するこれらのペプチドのサブセットが、腫瘍のネオエピトープを構成する。

40

50

【0364】

本明細書で使用される場合、「 K_D 」または「 k_D 」または「 K_D 」という用語は、当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有し、抗体（またはその抗原結合断片）と抗原との間の結合反応の平衡解離定数を指す。 K_D の値は、抗体オフ速度定数（ k_{off} ）の抗体オン速度定数（ k_{on} ）に対する比の数値表現である。 K_D の値は、抗原に対する抗体の結合親和性に反比例する。 K_D 値が小さいほど、抗原に対する抗体の親和性は高い。親和性は、当技術分野で公知の任意の方法によって測定することができる。

【0365】

本明細書で使用される場合、用語「 k_{off} 」または「 k_{off} 」は、当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有し、抗体/抗原複合体からの抗体の解離に関するオフ速度定数を指す。 k_{off} の値は、1秒間あたりに崩壊または解離する複合体の割合の数値表現であり、単位 s^{-1} で表される。

【0366】

本明細書で使用される場合、「 k_{on} 」または「 k_{on} 」という用語は、当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有し、抗体と抗原との会合に関するオン速度定数を指す。 k_{on} の値は、抗体および抗原の1モル（1M）溶液中で1秒間あたりに形成される抗体/抗原複合体の数の数値表現であり、単位 $M^{-1}s^{-1}$ で表される。

【0367】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」、「特異的に結合する」、「選択的結合」および「選択的に結合する」という用語は、特定の抗原またはエピトープ（例えば、NPM1c : HLA-A2）に対して感知可能な親和性を示し、一般に、他の抗原およびエピトープ（例えば、HLA-A2単独、例えば、NPM1cネオエピトープ単独、例えば、HLA-A2と複合体を形成した非NPM1cネオエピトープ）には結合しないか、または実質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片を意味することを意図している。「感知可能な」または好ましい結合には、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、もしくは 10^{-10} Mまたはより良好な K_D との結合が含まれる。抗体抗原相互作用の K_D （親和定数）は、抗体および抗原分子の50%が結合する抗体の濃度を示す。したがって、好適な一定の抗原濃度では、親和性のより高い（すなわち、より強い）抗体の50%は、親和性のより低い抗体と同じパーセント結合を達成するために必要とされるよりも低い抗体濃度で抗原分子に結合すると考えられる。したがって、 K_D 値が低いほど、より高い（強い）親和性を示す。本明細書で使用される場合、「より良好な」親和性は、より強い親和性であり、その比較対象よりも低い数値であり、 10^{-7} Mの K_D は、 10^{-6} Mの K_D よりも低い数値であり、したがって、より良好な親和性を表す。 10^{-7} Mよりも良好な（すなわち、 K_D 値が低く、したがってより強い）、好ましくは 10^{-8} Mよりも良好な親和性が一般に好ましい。本明細書に記載される値の中間値も想定しており、好ましい結合親和性は親和性の範囲として示すことができ、例えば、本明細書に開示されるNPM1c : HLA-A2に結合する抗体について好ましい結合親和性は $10^{-7} \sim 10^{-12}$ M、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ Mである。

【0368】

抗原に「結合しない」または「実質的に結合しない」抗体は、オフターゲット抗原（例えば、MHCクラスIタンパク質単独、例えば、ネオエピトープ単独、例えば、MHCクラスIタンパク質と複合体を形成した対照ペプチド）に感知できる程度には結合しないものである。例えば、一実施形態では、NPM1c : HLA-A2に特異的に結合する抗体は、例えば、HLA-A2単独、NPM1cネオエピトープ単独、および/またはHLA-A2と複合体を形成した非NPM1cネオエピトープよりも、NPM1c : HLA-A2に対して少なくとも2桁、好ましくは3桁、または4桁もしくはそれを上回る高さの良好な結合親和性（すなわち、2桁、3桁、または4桁もしくはそれよりも小さい K_D 値を示す結合）を示す。特異的または選択的結合は、そのような結合を決定するための当技術分野で認識されている任意の手段に従って決定することができ、これには例えば、Scatchard分析、Biacore分析、バイオレイヤー干渉法、および/または競合的

10

20

30

40

50

(競合)結合アッセイが含まれる。

【0369】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有し、それに連結された別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは追加のDNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、この場合は追加のDNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲートすることができる。ある特定のベクターは、それが導入された宿主細胞において自律複製が可能である(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード性哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製され得る。さらに、ある特定のベクターは、それに作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことができる。そのようなベクターを、本明細書では「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA手法に使用される発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、互換可能に使用され得る。しかし、本発明は、同等の機能を果たす他の形態の発現ベクター、例えば、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)も含むことを意図している。

10

【0370】

本明細書で使用される場合、「HLA-A」という用語は、当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有し、ヒトにおけるHLA-A座位によってコードされるヒト白血球抗原(HLA)の群を指す。HLAは、ヒトに特異的な主要組織適合抗原複合体(MHC)抗原である。HLA-Aは、ヒトMHCクラスI細胞表面受容体の主要な3種類のうちの1つである。他にはHLA-BおよびHLA-Cがある。HLA-Aタンパク質はヘテロ二量体であり、重鎖およびより小さい鎖で構成される。鎖はバリエーションHLA-A遺伝子によってコードされ、鎖(2-ミクログロブリン)はインバリエーション2ミクログロブリン分子である。2ミクログロブリンタンパク質は、ヒトゲノムの別の領域によってコードされる。HLA-A*02(A*02)は、HLA-A血清型群に属するヒト白血球抗原血清型である。この血清型は、HLA-A鎖の2ドメインの抗体認識によって決定される。A*02の場合、鎖はHLA-A*02遺伝子によってコードされ、鎖はB2M座位によってコードされる。

20

30

【0371】

本明細書で使用される場合、「有効用量」または「有効量」という用語は、所望の治療効果を達成するのに、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量を指す。

【実施例】

【0372】

大部分のキメラ抗原受容体-T(CAR-T)細胞療法は腫瘍関連抗原(TAA)を標的としている。この療法は、正常組織中での低いレベルの発現によるオンターゲット/オフ腫瘍毒性、および腫瘍細胞によるTAA発現の喪失による腫瘍耐性をもたらすことがある。本明細書に記載したように、腫瘍特異的発がんドライバー遺伝子変異に起因する細胞内ネオ抗原由来のネオエピトープを標的とするscFVを、ヌクレオフォスミンにおける4ヌクレオチドの複製であり、急性骨髄性白血病(AML)の約35%におけるドライバー発がん遺伝子変異であるNPM1cにおいて同定した。NPM1における変異はクローナルであり、白血病誘発の初期における悪性の形質転換に重要である。変異によって、最も一般的なHLA-A2アレルによって提示されるネオエピトープが創成される。具体的には、NPM1cによって、最も一般的なHLA-A*0201アレル(ヒト人口の約50%)によって提示される白血病特異的ネオ抗原エピトープ(AIQDLC LAV(配列番号1)、AIQと略す)が産生される(Greiner et al., BLOOD 120: 1282 (2012)を参照)。

40

50

【0373】

A I Qネオエピトープに対して特異的なC D 8⁺ T細胞応答を有するN P M 1 c⁺のA M L患者は、ネオエピトープに対するC D 8⁺ T細胞応答を有しないN P M 1 c⁺のA M L患者より劇的に良好な全生存期間を有することが示された(Greiner, J. et al., B L O O D 122:1087 (2013))。さらに、V a n d e r L e eらは、H L A - A 2によって提示されるN P M 1 cネオエピトープC L A V E E V S L (配列番号72)を認識するT細胞受容体(T C R)を同定し、そのようなT C Rを形質導入されたT細胞はN P M 1 c⁺ H L A - A 2⁺のA M Lの殺滅に効果的であることを示した(van der Lee et al., J C L I N I N V E S T 129: 774 (2019)を参照)。しかし、そのような療法の欠点は、外因性と内因性のT C Rの鎖と鎖との間のT C R鎖の誤対合のリスクであり、これは毒性の可能性および有効性の低減をもたらす(van der Lee et al., J C L I N I N V E S T 129: 774 (2019); Bendle et al., N A T M E D 16: 565, 1p (2010); van Loe nen et al., P r o c N a t l A c a d S c i U S A 107: 10972 (2010)を参照)。T C Rについてのもう1つの主要な課題は、腫瘍抗原に対する結合親和性が低いことである(Zha ng. & Wang,. T e c h n o l C a n c e r R e s T r e a t 18 1078098716 (2019)を参照)。

【0374】

本明細書に記載したように、一連の陽性および陰性の選択ステップを使用する酵母表面ディスプレイを使用して、N P M 1 cエピトープ-H L A - A 2複合体(すなわちA I Q - H L A - A 2)には特異的に結合するが、H L A - A 2単独または対照ペプチドもしくはその他の抗原ペプチドがロードされたH L A - A 2(例えばがん精巢抗原N Y - E S O - 1エピトープS L L M W I T Q C (配列番号62)がロードされたH L A - A 2すなわちS L L - H L A - A 2、例えばインフルエンザウイルスM 1エピトープG I L G F V F T L (配列番号63)がロードされたH L A - A 2すなわちG I L - H L A - A 2)に結合しないH i t s c F vを同定した。さらに、単離したs c F vのA I Q - H L A - A 2複合体に対する親和性は約7 n Mと決定され、これは典型的なT C Rの関連するペプチド-M H C複合体に対する親和性より10~100倍高い。単離されたs c F vを発現する操作されたC A R - T細胞は、i n v i t r oとi n v i v oの両方でN P M 1 c⁺ H L A - A 2⁺白血病細胞に対して強力な細胞傷害性を呈することが見出されたが、N P M 1 c⁻ H L A - A 2⁺白血病細胞またはH L A - A 2⁻腫瘍細胞に対しては細胞傷害性を呈さなかった。本明細書に記載した結果は、N P M 1 c⁻ C A R - T細胞が、A M L等のN P M 1 c⁺ H L A - A 2⁺がんを処置するためのがん特異的免疫療法として有用であり、おそらく低減したオンターゲット/オフ腫瘍毒性および腫瘍耐性を伴うことを示している。

【0375】

本明細書に記載したように、s c F v(「Y G 1」と称する)は、H L A - A 2との複合体中のN P M 1 cネオエピトープ(A I Q D L C L A V ; 配列番号1)と高い親和性(約7 n M)で特異的に結合することが示された。H L A - A 2との複合体中のN P M 1 cネオエピトープ(A I Q D L C L A V ; 配列番号1)と特異的に結合するY G 1 s c F vを含むC A Rポリペプチド(N P M 1 c C A R)を生成した。N P M 1 c C A Rポリペプチドを発現するT細胞(特にC D 8⁺ T細胞)は、A M L細胞をi n v i t r oで特異的に殺滅し、白血病負荷を低減し、A M Lマウスモデル(A M L腫瘍細胞を注射)におけるi n v i v oの生存期間を延長する。具体的には、Y G 1 s c F vを発現する操作されたC A R - T細胞は、i n v i t r oとi n v i v oの両方でN P M 1 c⁺ H L A - A 2⁺白血病細胞と初代A M L芽細胞とに対して強力な細胞傷害性を呈するが、N P M 1 c⁻ H L A - A 2⁺白血病細胞またはH L A - A 2⁻腫瘍細胞に対しては細胞傷害性を呈さない。

【0376】

したがって、N P M 1 c C A R - T細胞は、腫瘍細胞集団の不均一性にも関わらず、N P M 1 c⁺ H L A - A 2⁺白血病細胞を特異的に標的とし、したがって腫瘍耐性の進行を低減することが期待される。さらに、健常な組織ではN P M 1 cの発現がないので、N

PM1c CAR-Tはオンターゲット/オフ腫瘍毒性がない、またはごくわずかで、抗腫瘍免疫を媒介することが期待される。実際、YG1 scFvを発現する操作されたCAR-T細胞は、CD34⁺の正常な造血幹/前駆細胞と反応しないことが見出された。

【0377】

さらに、TCRおよび従来CARアプローチと比較して、ペプチド-HLA複合体を標的とするscFvは、NK細胞を武装させる独特の利点を有していることが期待される。NK細胞は通常、HLAの発現がないか、または低い標的細胞を認識してこれを殺滅する(Vivier et al., SCIENCE 331: 44 (2011))。理論には縛られないが、HLAの発現を欠く、または低レベルのHLA分子を有する白血病細胞は、高レベルのHLAを発現する白血病細胞と同様に、NK細胞によって優先的に殺滅され、したがってより多くのAIQ-HLA-A2標的がNPM1c CAR-NK細胞によって効率的に殺滅される。抗原の喪失はCAR-T療法に続く腫瘍耐性の重要な機序である(Shah & Fry, NAT REV CLIN ONCOL 16: 372 (2019))ので、NPM1c CAR-NK細胞は治療への耐性および疾患の再発を低減するために特に有効であろう。例えば、本明細書に開示した結果に基づいて、誘導多能性幹細胞(iPSC)をNK細胞に分化させて(Hermanson, et al., STEM CELLS 34: 93 (2016)を参照)、標準化された標的化「既製」リンパ球を抗がん免疫療法のための臨床的スケールで提供することができる(Li et al., CELL STEM CELL 23: 181 (2018)を参照)。したがって、HLA-A2⁺NPM1c⁺のがん患者(例えばHLA-A2⁺NPM1c⁺のAML患者)における抗白血病有効性を改善するためのNPM1c CARのNK細胞への組み込みも、本明細書で企図される。

10

20

【0378】

略語

AIQ: AIQDLCLAV(配列番号1)、AML: 急性骨髄性白血病、アロSCT: 同種造血幹細胞移植、BLI: 生物発光イメージング、CAR: キメラ抗原受容体、CAR-T: キメラ抗原受容体T細胞、FACS: 蛍光活性化細胞選別、FBS: ウシ胎児血清、GIL: GILGFVFTL(配列番号63)、HSC: 造血幹細胞、MACS: 磁気活性化細胞選別、NPM1: ヌクレオフォスミン、NPM1c: 変異型ヌクレオフォスミン、scFv: 一本鎖可変断片、SLL: SLLMWITQC(配列番号62)、TAA: 腫瘍随伴抗原、TCR: T細胞受容体、HSPC: 造血幹/前駆細胞。

30

【0379】

実施例1~7で使用した材料および方法

ペプチド-HLA-A2複合体の調製

変異体NPM1c由来のCD8⁺T細胞エピトープペプチド(AIQDLCLAV(配列番号1)、AIQと略す)およびがん精巢抗原NY-ESO-1由来の対照ペプチド(SLLMWITQC(配列番号62)、SLLと略す)、ならびにインフルエンザウイルスM1タンパク質(GILGFVFTL(配列番号63)、GILと略す)は、Genscriptによって合成し、精製した。組換えヒトHLA-A2:Ig融合タンパク質(DimerXI)はBD Biosciencesから得た。ペプチド-HLA-A2複合体は製造者のプロトコールに従って調製した。簡単に述べると、ペプチドをHLA-A2:Ig融合タンパク質とモル比640:1で混合し、混合物を37℃で終夜インキュベートして自発的に複合体を形成させた。ペプチドがロードされたHLA-A2:Ig融合タンパク質をペプチド-HLA-A2と称し、4℃で1週間まで保存した。

40

【0380】

酵母培地の処方

SDCAA培地: 20gのデキストロース、6.7gのDifco酵母窒素ベース、5gのバクトカザミノ酸、10.2gのNa₂HPO₄・7H₂O、および8.56gのNaH₂PO₄・H₂Oを脱イオン水に溶解して体積1リットルとし、0.2μmのフィルターユニットを使用して濾過滅菌した。

【0381】

50

SGCAA培地：20gのガラクトース、6.7gのDifco酵母窒素ベース、5gのバクトカザミノ酸、10.2gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、および8.56gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を脱イオン水に溶解して体積1リットルとし、0.2 μm のフィルターユニットを使用して濾過滅菌した。

【0382】

SDCAAプレート：10.2gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および8.56gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、182gのソルビトールおよび15gのバクトアガーを脱イオン水に溶解して体積900mlとし、オートクレーブした。別個のビーカー中で20gのデキストロース、6.7gのDifco酵母窒素ベース、および5gのバクトカザミノ酸を脱イオン水に溶解して体積100mlとし、濾過によって滅菌した。オートクレーブした混合物を攪拌しながら50°C未満まで冷却し、濾過滅菌した溶液と合わせて混合してプレートに注いだ。

10

【0383】

SG-2xSCAA培地：SG(6.7gのDifco酵母窒素ベース、20gのガラクトース、10.2gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、および8.56gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、190mgのArg、400mgのAsp、1,260mgのGlu、130mgのGly、140mgのHis、290mgのIle、400mgのLeu、440mgのLys、108mgのMet、200mgのPhe、220mgのThr、52mgのTyr、380mgのVal、および1gのBSAを脱イオン水に溶解して体積1リットルとし、濾過によって滅菌した。

20

【0384】

細胞株の培養

OCl-AML3細胞、T2細胞、およびPC-3細胞はATCCから購入した。OCl-AML2細胞はDSMZから購入した。OCl-AML3細胞およびOCl-AML2は、10%のFBS(Life TechおよびVWR)および2mMのL-グルタミン(Thermo Fisher Scientific)を補充したRPMI 1640培地(Gibco)中で培養した。GMB細胞は、発がん遺伝子c-MycおよびBcl2を形質導入したヒト造血幹細胞(HSC)を既に述べたように免疫欠損マウスに移植することによって生成した(Leskov et al., ONCOGENE 32: 1066 (2013); Pallasch et al., CELL 156: 590 (2014)を参照)。GMB細胞は、110mg/Lのピルビン酸ナトリウム、1x非必須アミノ酸、1x2-メルカプトエタノール、および10%のFBSを補充したDMEM培地(Gibco)中で培養した。T2細胞(174xCEM.T2)(ATCC(登録商標)CRL1992(商標))は、20%のFBSを補充したIMDM培地(Gibco)中で培養した。PC-3細胞は、10%のFBSを補充したF-12K培地(ATCC)で培養した。すべての培地には、1%v/vのペニシリン-ストレプトマイシン溶液(Life Technologies)を補充した。

30

【0385】

AIQ-HLA-A2複合体に特異的なヒトscFvの単離

AIQ-HLA-A2複合体を認識するヒトscFvを、既述のように、酵母表面にディスプレイされた非免疫ヒトscFvライブラリーから磁気活性化細胞選別選択(MACS)を使用して単離し、続いて蛍光活性化細胞選別(FACS、Aria2)を使用して選択した(Chao et al., NAT PROTOC 1: 755 (2006)を参照)。AIQ-HLA-A2複合体に特異的なscFvを富化するため、SLL-HLA-A2複合体およびHLA-A2タンパク質を陰性選択に使用した。AIQ-HLA-A2、SLL-HLA-A2、およびHLA-A2は、選択の各ラウンドの前にビオチン化した。各ラウンドからの選択した酵母のプールをSDCAA培地中で終夜増殖させ、SGCAA培地中でscFvを発現するように誘導した。後の方の選択のラウンドに使用した誘導された酵母細胞の数は、前の選択のラウンドからの選択された酵母細胞の数の約10倍であった。AIQ-HLA-A2複合体を認識するscFvの単離の戦略を図1Aおよび図1Bに示す。AIQ-HLA-A2による陽性選択およびそれに続くSLL-HLA-A2による陰性選択を

40

50

含む2ラウンドのMACS選択の後で、選択した酵母プールを多数ラウンドのFACS選択に供した(図1B)。各ラウンドのFACS選択の間に、選択した酵母細胞プールをフローサイトメトリーによってHLA-A2、GIL-HLA-A2、SLL-HLA-A2、およびAIQ-HLA-A2への結合についてアッセイした(図1C)。

【0386】

選択した酵母細胞からのプラスミドDNAの単離およびscFvのシーケンシング

選択した酵母細胞の集団からのプラスミドDNAを、Zymo prepキット(Zymo Research)を使用し、製造者の使用説明書に従って単離した。プラスミドの単離に使用した酵母細胞の数は、選択した集団中の異なる酵母クローンのそれぞれからディスプレイプラスミドを得るために期待された集団多様性より少なくとも10倍高かった(Chao et al., NAT PROTOC 1: 755 (2006)を参照)。アルファセレクトゴールド大腸菌(E. coli)コンピテント細胞(BioLine)を5 μ LのプラスミドDNAで形質転換し、LB Ampプレートに播種し、37 $^{\circ}$ Cで終夜インキュベートした。25個の単一コロニーをランダムに採取し、LB Amp培地に接種して、200rpmで振盪しながら37 $^{\circ}$ Cで終夜増殖させた。次いでこれら25個の培養からミニプレップ(QIAGEN)によってプラスミドDNAを調製し、以下のプライマーを使用してscFvをシーケンシングした。フォワード、5'-GTCAGTAATTGCGGTTCTCACCC-3'(配列番号64)、リバーズ、5'-GTACAGTGGGAACAAGTCG-3'(配列番号65)。

【0387】

scFvクローンの特徴解析

Frozen-EZ Yeast Transformation IIキット(Zymo Research)を使用して、RJY100コンピテント酵母細胞を調製した。目的の単一scFvクローンのためのディスプレイプラスミドを、製造者のプロトコールに従ってコンピテント酵母細胞に形質転換した。単一クローンは、形質転換した酵母細胞をSDCAAプレートに播種し、それが視認できるコロニーを形成するまで30 $^{\circ}$ Cで2日を超えてインキュベートすることによって得た。3~5個のクローンをランダムに選択して5mLのSDCAA培養中に個別に接種し、250rpmで振盪しながら30 $^{\circ}$ Cで終夜増殖させた。酵母表面におけるscFvの発現を誘導するため、SDCAA培養からの5 \times 10⁷個の酵母細胞を5mLのSGCAA培地に接種し、250rpmで振盪しながら20 $^{\circ}$ Cで少なくとも20時間、誘導した。得られた酵母細胞をビオチン標識HLA-A2、GIL-HLA-A2、SLL-HLA-A2、またはAIQ-HLA-A2とともにインキュベートし、続いて氷上、暗所でストレプトアビジン-APC(BioLegend)およびFITC標識抗c-Myc抗体(Abcam)によって20分、染色した。染色した酵母細胞をフローサイトメトリー(LSR II HTS-1)により、1試料あたり少なくとも20,000イベントを収集して解析した。

【0388】

可溶性scFv-Fcタンパク質の発現

可溶性scFv-Fcタンパク質は、切り替え可能な酵母ディスプレイ/分泌系を使用して産生した(Van Deventer et al., PROTEIN ENG DES SEL 28: 317 (2015)を参照)。ScFv DNAを合成し(Integrated DNA Technologies、IDT)、Q5 High-Fidelity 2x Master Mix(NEB)を使用するPCRによってFc断片を増幅した。PCRプライマーは5'-CCGGGGTAGAACCTAAAAGTTCCG-3'(配列番号66)(フォワード)および5'-TTTGTCTGACGCGTGGATC-3'(配列番号67)(リバーズ)であった。切り替え可能な酵母ディスプレイ/分泌ベクター骨格pCHA-FcSup-TAGは、酵素NheIおよびBamHIによって二重消化した。ゲル精製の後、ベクター骨格、scFv DNA、およびFc DNA断片を、Gibson Assembly Master Mix(New England BioLabs、NEB)を使用して製造者のプロトコールに従ってアSEMBルした。2 μ LのアSEMBリー反応混

合物をアルファセレクトゴールド大腸菌 (*E. coli*) コンピテント細胞 (*Bioline*) 中に形質転換した。形質転換した細胞を 37 °C で 60 分振盪 (200 rpm) し、次いで LB アンピシリンプレートに播種した。コロニーを採取し、プラスミド抽出のためにアンピシリン含有液体 LB 培地中で増殖させた。得られたプラスミドをシーケンシングした。シーケンシングプライマーは 5' - GGGTAATTAATCAGCGAAGCGATG - 3' (配列番号 68) (フォワード) および 5' - GTACAGTGGGAACAAAGTCG - 3' (配列番号 65) (リバーズ) であった。正しいプラスミドを RJY100 コンピテント酵母細胞中に形質転換した。形質転換した酵母細胞を SD - SCAA 培地中、250 rpm で振盪しながら 30 °C で飽和するまで終夜増殖させた。飽和した培養物をペレット化し、200 ml の SG - 2 x SCAA 誘導培地中で OD₆₀₀ が 1.0 になるよう再懸濁した。次いで再懸濁した培養物を 250 rpm で振盪しながら 20 °C で 4 日間、増殖させた。酵母細胞を 10,000 x g で 15 分、ペレット化し、0.2 μM のフィルター (Pall Corporation) を使用して上清を濾過した。濾液の pH は 10 x PBS、pH 7.4 (Gibco) で pH 7.4、最終濃度 1 x に調整した。scFv - Fc は、1 ml のレジン (Genscript) を含有する前平衡化したプロテイン A カラムに、製造者のプロトコールに従って濾液を 2 回通すことによって精製した。SDS - PAGE によってレジンへの結合効率を測定するために、通過した培地を採取した。scFv - Fc が結合したレジンを、10 mL の結合 / 洗浄緩衝液を使用して 3 回洗浄した。10 mL の溶出緩衝液を使用して scFv - Fc をレジンから溶出させた。scFv - Fc を含有する溶出液を、直ちに中和緩衝液 (全溶出液の 1 / 10 体積) で pH 7.4 に中和した。中和した溶出液を濃縮し、遠心濾過ユニット (Millipore 30 kDa 分子量カットオフ) を使用して 1 x PBS に緩衝液交換した。ScFv - Fc は Nanodrop 分光光度計 (Thermo Scientific) における A280 の測定によって定量化し、5% のスタッキングゲルおよび 6% の分離ゲルを使用する SDS - PAGE によって純度を評価した。標的細胞の表面上の AIQ - HLA - A2 複合体に対する精製した scFv - Fc タンパク質の特異的結合を、5 nM のタンパク質を使用して 200 μl の PBS 緩衝液中の 5 x 10⁵ 個の標的細胞とともに室温で 30 分間インキュベートし、続いて PE 標識抗 HA タグ抗体で染色してフローサイトメトリーによって評価した。

【0389】

バイオレイヤー干渉法による scFv - Fc の親和性の決定

バイオレイヤー干渉法実験は、Octet RED96 装置 (Fortebio Inc.) を使用して 25 °C で実施した。すべてのステップで使用した同じ緩衝液は、0.05% の Tween 20 および 0.1% の BSA を含む結合緩衝液で構成された。scFv - Fc 融合タンパク質は、EZ - Link - NHS - PEG4 - Biotin (Thermo Scientific) を使用してビオチン化した。ストレプトアビジンでコートしたバイオセンサー (Streptavidin Dip and Read Biosensors, Fortebio Inc.) に、体積 200 μL の 20 μg / mL のビオチン化 scFv - Fc タンパク質を、すべてのセンサー (参照センサーを除く) が 0.5 nM の捕捉閾値に達するまでロードした。60 秒のそそぎ、および緩衝液単独でのベースラインステップの後、1 : 2 の希釈系列 (0 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM、20 nM、40 nM、および 80 nM) の抗原 (AIQ - HLA - A2 複合体、SLL - HLA - A2 複合体、または HLA - A2) にセンサーを曝露した。抗原との会合を 1,000 秒間モニターし、解離を緩衝液単独中で 1,500 秒、行った。データ解析は ForteBio Data Analysis 8.2 (Fortebio) を使用して実施した。データの組は、K_{on}、K_{off}、および K_D を決定するための 1 : 1 結合モデルに適合した。

【0390】

CAR ベクターの設計

YG1 または CD19 scFv、CD8 リーダー配列、細胞外ヒンジドメインおよび

び膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、ならびにCD3ゼータ活性化ドメインからなるCARの配列は、Integrated DNA Technologies (IDT)によって特注で合成した。自己切断性P2A、それに続くEGFPからなる第2の断片(P2A-EGFP)を、同じ手段で合成した。pHIVベクター(プラスミド#21373)は、酵素XbaIおよびClaIによって二重消化した。ベクター骨格をゲル精製した後、pHIV骨格、CAR断片、およびP2A-EGFP断片を、HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs)を使用し、製造者のプロトコールに従って、5'および3'末端におけるそれらの重複領域に基づいてアセンブルした。得られたプラスミドを、以下のシーケンシングプライマー、5'-GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT-3'(配列番号69)(フ 10
ォワード)および5'-AGGCACAATCAGCATTTGGTAGCTG-3'(配列番号70)(リバーズ)を使用してシーケンシングした。適正な配列を有するプラスミドを、pHIV-CAR-EGFPと命名した。

【0391】

CAR発現初代ヒトT細胞の生成

レンチウイルスは、293T細胞にpHIV-CAR-EGFP、pCMV-VSVG、pCMV-8.9、およびpAdvプラスミドをトランスフェクトすることによって生成した。48時間および72時間で培養上清を採取し、25,000rpm、4、2時間の超遠心によってレンチウイルス粒子をペレット化した。レンチウイルス粒子を100μLの無血清DMEM培地中に懸濁し、-80で凍結した。ヒトCD8⁺T細胞は、HLA-A2⁺のドナー末梢血単核細胞(PBMC)から、EasySep(商標)Human CD8⁺T Cell Isolation Kit(Stem Cell)を使用して単離した。単離したT細胞の純度(>95%)は、CD3およびCD8を染色するFACSを使用して定量化した。CD8⁺T細胞を、T Cell TransAct(商標)(Miltenyi)を使用して活性化および増大させ、50IU/mLのIL-2(Miltenyi)、3%のウシ胎児血清(FBS)、および1%のペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies)を補充したTexMACS Medium(Miltenyi)中で培養した。TransAct(商標)による刺激の4日後に、T細胞にレンチウイルスを形質導入した(MOI=10)。EGFP⁺CAR-T細胞をFACSによって精製し、T細胞上のCARの発現を、Alexa Fluor(登録商標)647 AffiniPure Fab'₂断片ヤギ抗ヒトIgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch)を使用して決定した。CAR-T細胞を、10ng/mLの組換えヒトIL-7(Peprotech)、5ng/mLの組換えヒトIL-15(Peprotech)、3%のウシ胎児血清(FBS)、および1%v/vのペニシリン-ストレプトマイシン溶液(Life Technologies)を補充したTexMACS Medium(Miltenyi)中で使用前10日間、増大させた。 20 30

【0392】

in vitroにおけるCAR-T細胞の細胞傷害性

標的細胞を殺滅するCAR-T細胞の能力を評価するため、CD8⁺CAR-T細胞を、表示したエフェクター：標的比で標的細胞とインキュベートした。細胞を混合した直後(0時間)およびインキュベーション後24時間で、血清を含まないPBSで細胞を洗浄し、Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kits(Invitrogen)を使用して製造者のプロトコールに従って染色した。次いで細胞をFITC抗ヒトCD8、PE抗ヒトCD33、またはPE抗ヒトCD19抗体によって氷上、暗所で30分、染色した。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリー(LSRII HTS-1)によって解析した。各試料の特異的細胞溶解は以下の式を使用して計算した。細胞溶解(%) = {1 - [CAR-T群中の(24時間における標的細胞% / 0時間における標的細胞%) / 非形質導入T群中の(24時間における標的細胞% / 0時間における標的細胞%)]} × 100。 40 50

【0393】

細胞内サイトカインの染色

CARを形質導入した、または非形質導入ヒトCD8⁺T細胞を、96ウェル丸底プレートで、いかなるサイトカインも含まず10%のFBSを含有するRPMI-1640中、タンパク質輸送阻害剤であるモノニン(BD Biosciences)およびプレフェルジンA(BioLegend)の存在下、 2×10^6 個細胞/mL、標的細胞と1:1の比で、37[°]、5%CO₂中、12時間、共培養した。細胞を洗浄し、Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stainで染色し、続いてCD3について表面染色し、次いで固定し、透過処理して、抗IFN- γ -APC-Cy7(BioLegend)および抗IL-2-APC(BioLegend)によって細胞内染色した。細胞をフローサイトメトリー(LSR Fortessa HTS-2)によって解析し、生存しているCD3⁺リンパ球をさらなる解析のためにゲーティングした。

【0394】

in vivoにおけるCAR-T細胞による標的細胞の殺滅

NOD-scid IL2rg^{nu11}(NSG)マウスはJackson Laboratoriesから購入し、Massachusetts Institute of Technology(MIT)の特定病原体のない(SPF)動物舎に収容した。マウスを用いるすべての実験は、Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認された。簡単に述べると、ルシフェラーゼを発現するOCI-AML3細胞(1×10^6 個)、GMB細胞(2×10^6 個)、またはOCI-AML2細胞(1×10^6 個)を200 μ LのPBS中で尾静脈注射によってNSGマウスに注射した。4日後に、GFPの発現に基づいて選別した 1×10^7 個のCAR-T細胞または活性化したが非形質導入ヒトT細胞を腫瘍担持マウスに注射した。3日ごとにXenogen IVIS-200 Spectrumカメラを使用して生体発光イメージング(BLI)を実施した。

【0395】

フローサイトメトリーによってT細胞および腫瘍細胞を解析するため、T細胞注射の18日後に血液、脾、骨髄、および肝を収集した。4mMのEDTAを含む1mLのPBSが入ったマイクロ遠心管の中に心穿刺によって約200 μ Lの血液を採取した。細胞を1,500rpmで5分、遠心分離することによってペレット化し、混合物を1mLのACK Lysis Buffer(Lonza Bioscience)中で穏やかに上下にピペティングすることによって再懸濁し、室温に5分間、保った。細胞を1,500rpmで5分間、遠心分離し、次いでFACS緩衝液中に再懸濁した。臓器の収集に先立って、上腸間膜静脈を通して5mLのPBSで肝を灌流した。脾および肝は、シリンジプランジャーを使用して70 μ mのストレーナーを通して加圧することによって、機械的に破壊した。破壊した肝を、2mg/mLのコラーゲナーゼD(Sigma-Aldrich、USA)により、37[°]で30分間、消化した。骨髄細胞は、5mLの冷PBSを流すことによって両側の大腿骨から採取した。単一細胞懸濁液を調製し、赤血球を溶解させた。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、1,500rpm、4[°]で5分間、遠心分離し、FACS緩衝液で再懸濁し、トリパンブルー染色で計数した。

【0396】

フローサイトメトリー解析のため、5百万個の細胞を分注し、20 μ Lのヒト血清と混合して5分間、Fc受容体をブロックした。次いで、細胞を以下のコンジュゲート抗体によって、氷上、暗所で30分間、染色した。抗mCD45.1-BUV737(BD Biosciences)、抗hCD45-APC-Cy7(BioLegend)、抗hCD8-PE(BioLegend)、抗CD33-APC(BioLegend)、抗hPD1-PE-Cy7(BioLegend)、および抗Tim-3-BV711(BioLegend)。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、DAPIを含有するFACS緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリー解析は、LSR Fortessa HTS-

2 フローサイトメーター (BD Biosciences) を使用し、1 試料あたり 100,000 イベントを収集して実施した。

【0397】

統計解析

他に述べない限り、データは少なくとも3回の独立した実験からの平均 \pm s.e. として表す。2つの独立群を比較するために、両側 t 検定を使用した。in vivo における腫瘍成長は、2方向繰り返し測定 ANOVA を使用して比較した。腫瘍担持マウスにおける生存パターンを解析するためにカプラン・マイヤー法を使用し、統計的差はマンテル・コックスログランク検定に従って評価した。p 値 0.05 未満を統計的有意とみなした。すべての統計解析は SPSS Statistics 22 ソフトウェアを使用して実施した。

10

【0398】

ルシフェラーゼ活性の測定による細胞傷害性のアッセイ

CAR-T 細胞の細胞傷害性のアッセイを、ルシフェラーゼ発現標的細胞株を使用して実施した。T 細胞を、表示したエフェクター：標的 (E:T) 比で 24 時間、標的細胞とともにインキュベートした。次いで細胞を PBS 中で 1 回すすぎ、ルシフェラーゼ細胞培養溶解試薬 (Promega) で溶解し、続いてルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega) と混合した。プレート分光光度計 (Infinite M200 PRO、TECAN) を使用して、細胞溶解物の発光を解析した。標的細胞単独の発光をベースライン対照として使用した。各試料の比細胞溶解性は、以下の式を使用して計算した。比細胞溶解性 (%) = $100 \times \{1 - [(CAR-T \text{ 群における発光} / \text{標的細胞単独における発光}) / (\text{非形質導入 T 群における発光} / \text{標的細胞単独における発光})]\}$ 。

20

【0399】

Quantibody Human Cytokines Array

Quantibody Human Cytokines Array 1 (QAH-CYT-1) は、Raybiotech から購入した。1 枚のガラススライドに 16 ウェルの同一のサイトカイン抗体アレイをスポットする。各ウェルは、20 種のヒトサイトカインについて四連測定の抗体スポットを含んでいた。4 名の健康なドナーから誘導した 2×10^5 個の NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞を、96 ウェルの丸底プレート中でいかなるサイトカインも含まず 10% の FBS を含有する RPMI-1640 中で、 1×10^5 個の NPM1c⁺HLA-A2⁺OCl-AML3 細胞と、37、5% CO₂ で 16 時間、共培養し、次いでサイトカインの定量のため、100 μ l の無細胞上清を各ウェルから採取した。アレイスライドは、製造者の使用説明書に従って取り扱い、処理した。数枚のスライドウェルは、標準曲線を計算するために純抗原で処理した。蛍光シグナルはレーザーキャナー (Axon GenePix) で検出した。データ抽出は、このアレイに特有の GAL ファイル (www.RayBiotech.com/Gal-Files.html) と一緒にマイクロアレイ解析ソフトウェア (GenePix) を使用して行い、スポットからの F488 全強度を ELISA Calc ソフトウェアによって解析した。各サイトカインの既知の濃度の標準曲線を確定し、次いで標準曲線への内挿によって試料中のサイトカインの濃度を計算した。

30

40

【0400】

プレジジョンカウントビーズを用いるフローサイトメトリーによる細胞傷害性アッセイ

患者由来の初代 AML 試料は、Dana-Farber Cancer Institute から購入した。NPM1c CAR-T 細胞を、表示したエフェクター：標的比で初代 AML 細胞とともにインキュベートした。24 時間のインキュベーションの後、細胞を無血清 PBS で洗浄し、Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kits (Invitrogen) を使用して製造者のプロトコールに従って染色した。次いで細胞を、FITC-抗ヒト CD8、PE-抗ヒト CD33 によって、氷上、暗所で 30 分間、染色した。細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、180 μ l の FACS 緩衝液に再懸濁し、次いで 20 μ l のプレジジョンカウントビーズ (BioLegend

50

d) を、製造者の使用説明書に従って総体積 200 μ l で細胞懸濁液に加えた。細胞はフローサイトメトリー (LSRII HTS-1) によって解析した。初代 AML 細胞の絶対細胞計数は、製造者の使用説明書の式に従って計算した。各試料の特異的細胞溶解は、以下の式：特異的細胞溶解 (%) = $100 \times [1 - (CAR-T \text{ 群中の初代 AML 細胞の絶対細胞計数} / \text{非形質導入 T 群中の初代 AML 細胞の絶対細胞計数})]$ を使用して計算した。

【0401】

ヒト HLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞 (HSPC) は、2名のドナーの胎児肝から EasySep Human CD34 Positive Selection Kit (Stem Cell Technologies) によって、既に述べたように精製した (Chen, Q. et al (2013) Stem Cells 31:1160; Kaur, M. et al (2019) J Immunol 202:1885 を参照)。NPM1c CAR-T 細胞を、表示したエフェクター：標的比で CD34⁺HSPC とともにインキュベートした。24時間のインキュベーションの後、細胞を無血清 PBS で洗浄し、Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kits (Invitrogen) を使用して製造者のプロトコールに従って染色した。次いで細胞を、FITC-抗ヒト CD8、PE-抗ヒト CD34 によって、氷上、暗所で30分間、染色した。上記のように、細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、180 μ l の FACS 緩衝液に再懸濁し、次いで 20 μ l のプレジジョン カウントビーズ (BioLegend) を、製造者の使用説明書に従って総体積 200 μ l で細胞懸濁液に加えた。細胞はフローサイトメトリー (LSRII HTS-1) によって解析した。CD34⁺HSPC の絶対細胞計数は、製造者の使用説明書の式に従って計算した。各試料の特異的細胞溶解は、以下の式：特異的細胞溶解 (%) = $100 \times [1 - (CAR-T \text{ 群中の CD34}^+ \text{ HSPC の絶対細胞計数} / \text{非形質導入 T 群中の CD34}^+ \text{ HSPC の絶対細胞計数})]$ を使用して計算した。本研究におけるヒト組織の使用は、Massachusetts Institute of Technology の Institutional Review Board によって承認された。

【0402】

初代 HLA-A2⁺NPM1c⁺AML 異種移植片の CAR-T 細胞による殺滅

患者由来の初代 NPM1c⁺HLA-A2⁺AML 試料は、Dana-Farber Cancer Institute から購入した。10週齢の NSG-SGM3 (NSGS) マウスは Jackson Laboratories から購入し、Massachusetts Institute of Technology (MIT) の特定病原体のない (SPF) 動物舎に収容した。マウスにおけるヒト初代 AML の生着効率を改善するため、NSGS マウスに初代 AML を注射する 24 時間前に、既に述べたように、ヒト IL-3 および GM-CSF をコードする 100 μ g の DNA プラスミドを水力学的に注射した (Chen, et al (2009) PNAS 106:21783 を参照)。NSGS マウスは 250 cGy で照射し、続いて照射後 24 時間以内に 1×10^6 個の初代 NPM1c⁺HLA-A2⁺AML 細胞を尾静脈に注射した。2週後に、GFP の発現に基づいて選別した 1×10^7 個の CAR-T 細胞、または同じ数の活性化したが非形質導入ヒト T 細胞を腫瘍担持マウスに注射した。AML 負荷は 9 日ごとに尾静脈からの採血によって末梢血中で定量化し、フローサイトメトリー (LSR Fortessa HTS-2、BD Biosciences) によって解析した。AML の生着は、循環ヒト CD45⁺CD8⁻細胞のパーセンテージとして定義した。

【0403】

増殖アッセイ

NPM1c CAR-T 細胞または非形質導入 T 細胞 (1×10^5 個) を、96 ウェルの丸底プレート中でいかなるサイトカインも含まず 10% の FBS を含有する RPMI-1640 中で、 1×10^5 個の NPM1c⁺HLA-A2⁺OCl-AML3 細胞と、37、5% CO₂ で 5 日間、共培養した。次いで細胞を収集し、Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen)、

FITC - 抗ヒトCD8 (BioLegend)、およびPE - 抗ヒトCD33 (BioLegend)で染色し、フローサイトメトリー解析の前にプレジジョンカウントビーズ (BioLegend)を加えた。CD8⁺T細胞の絶対細胞計数は、プレジジョンカウントビーズの製造者の使用説明書における式に従って計算した。細胞内Ki-67染色のため、細胞を洗浄し、Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stainで染色し、続いてCD8について表面染色し、次いで固定し、透過処理し、PE - 抗ヒトKi67 (BioLegend)によって、製造者のプロトコールに従って細胞内染色した。細胞はフローサイトメトリー (LSRII HTS-1)によって解析し、生存しているCD8⁺リンパ球をさらなる解析のためにゲーティングした。

【0404】

10

ウエスタンブロット

同数の細胞をPBSで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を補充したRIPA緩衝液中で溶解させた。全細胞抽出物をSDSローディング緩衝液に溶解し、95℃で5分間煮沸し、10% SDS-PAGEを使用して分離し、PVDF膜に転写した。5%の脱脂ミルクTBST溶液で膜をブロックした後、変異体NPM1c (NB110-61646SS; NovusBio)またはGAPDH (#3683; Cell Signaling Technology)に特異的な抗体で膜を精査した。

【0405】

[実施例1]

酵母表面ディスプレイによるAIQ-HLA-A2複合体に特異的なヒトscFvの単離

20

AIQ-HLA-A2複合体に特異的なヒトscFvの単離は、NPM1c変異を有するAMLの腫瘍特異的CAR-T療法を開発する基礎を形成した。酵母表面ディスプレイ (YSD) (Chao et al., NAT PROTOC 1: 755 (2006)を参照)を使用して、AIQ-HLA-A2複合体に特異的な高親和性のscFvを同定した。YSDによって、フローサイトメトリーによる酵母細胞表面における抗原への結合に基づく異なるscFvバリエーションの間の定量的な区別が可能になるので、高親和性scFvの選択をスクリーニングプロセスの間に達成することができる。さらに、ヒト脾B細胞からの(すなわち、完全にヒトの抗体配列からの)可変領域遺伝子断片の全レパートリーを使用して酵母ディスプレイライブラリーを構築したので、単離したscFvは既にヒト起源であって免疫原性が低下しており、したがってヒトへの使用のための療法の開発に好適である。AIQ-HLA-A2複合体を特異的に認識するscFvを単離するため、AIQ-HLA-A2複合体を陽性選択のために使用し、HLA-A2単独またはNY-ESO-1から誘導した対照エピトープペプチド (SLLMWITQC (配列番号62)がロードされたHLA-A2 (SLL-HLA-A2と略す)を陰性選択のために使用した (図1Aおよび図1B)。使用したYSDライブラリーは、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ の異なるクローンの多様性を有すると推定された。

30

【0406】

がん精巢抗原NY-ESO-1エピトープ (SLLMWITQC (配列番号62)、SLL-HLA-A2と略す)等の他の抗原ペプチドの存在下または非存在下でAIQ-HLA-A2複合体には特異性を有するが、HLA-A2には特異性を有しないscFvを単離するために、一連の陽性および陰性選択を実施した (図1Aおよび図1B)。ほぼ 1×10^{10} 個 (ライブラリーの多様性の少なくとも10倍)の酵母細胞を、可溶性ビオチン標識AIQ-HLA-A2複合体、続いてストレプトアビジン標識磁気ビーズとインキュベートし、磁気活性化細胞選別選択 (MACS)精製を行った (図1B、ラウンド1)。陽性選択した酵母細胞をほぼ10倍に増大させ、可溶性ビオチン標識SLL-HLA-A2複合体、続いてストレプトアビジン標識磁気ビーズとインキュベートし、MACS陰性選択を行った (図1B、ラウンド2)。結合していない酵母細胞を増大させ、可溶性ビオチン標識AIQ-HLA-A2複合体、続いてマウスIgGに特異的なPE標識抗体 (HLA-A2二量体のFc部分、図1A)およびscFvのC末端のc-Mycエピトープを検出するFITC標識抗c-Myc抗体とインキュベートした (図1A)。図1B (

40

50

ラウンド3、プロット#1)に示すように、約3.6%の酵母細胞が抗マウスIgGおよびc-Mycエピトープに対して陽性であった。二重陽性の酵母細胞を蛍光活性化細胞選別(FACS)によって単離した(図1B、ラウンド3)。

【0407】

AIQ-HLA-A2複合体に対するscFvの特異性をさらに富化するために、選別した酵母細胞を増大させ、一連の陽性選択(ビオチン標識AIQ-HLA-A2による)および陰性選択(ビオチン標識SLH-HLA-A2またはHLA-A2による)に供し、続いてストレプトアビジン-APCおよびFITC標識抗c-Myc抗体による染色および細胞選別を行った。富化を評価するため、選択した酵母細胞を、HLA-A2、GIL-HLA-A2[インフルエンザウイルスM1由来のGILGFVFTL(配列番号63)(GILと略す)ペプチドがロードされたHLA-A2(Choo et al., J VIROL 88: 10613 (2014)を参照)]、およびSLH-HLA-A2に対する非特異的結合、ならびにAIQ-HLA-A2に対する特異的結合について解析した(図1C)。例えば、ラウンド6(図1B)において、AIQ-HLA-A2複合体に対して高い親和性を有するscFvをディスプレイする酵母細胞を精製した。しかし、精製した酵母細胞の大部分はHLA-A2とAIQ-HLA-A2の両方に結合したが、GIL-HLA-A2およびSLH-HLA-A2には結合せず(図1C、プロット#11~14)、選択したscFvの大部分はペプチドを含まないHLA-A2に結合できることが示された。AIQ-HLA-A2に特異的なscFvをディスプレイする酵母細胞を選択するため、酵母細胞をHLA-A2で染色し、HLA-A2陰性酵母細胞を細胞選別によって精製した(図1B、ラウンド7、プロット#5)。選択した酵母細胞の約12%がHLA-A2およびc-Mycについて陽性(図1C、プロット#16)、22.8%がAIQ-HLA-A2およびc-Mycについて陽性(図1C、プロット#19)、および1%未満がGIL-HLA-A2またはSLH-HLA-A2について陽性であり(図1C、プロット#17および18)、AIQ-HLA-A2についてのscFvの富化を示した。さらなる陽性および陰性の選択(図1B、ラウンド8および9)について、AIQ-HLA-A2およびc-Mycについて大部分陽性(約60%、図1C、プロット#29)であるがHLA-A2について大部分陰性(3%未満、図1C、プロット#26)であった酵母細胞を選択した。

【0408】

scFvの配列を同定するため、選択した酵母細胞プールからプラスミドDNAを抽出し、大腸菌(E. coli)に形質転換した。プラスミドの単離およびシーケンシングのために、25個の単一コロニーをランダムに採取した。25個のうち24個は同一のscFv DNA配列(YG1と称する。以下の「配列」の部を参照)を有し、残りの1つは異なるscFv DNA配列(YG2と称する)を有していた。次いでYG1およびYG2を個別にRJY100コンピテント酵母細胞に形質転換し、酵母細胞をSGCAA培地中で培養することによってscFvの発現を誘導した。フローサイトメトリー解析によって、c-Myc陽性のYG1発現酵母細胞はAIQ-HLA-A2複合体についても陽性に染色されるが、HLA-A2、GIL-HLA-A2、またはSLH-HLA-A2複合体については染色されず、一方c-Myc陽性のYG2発現酵母細胞はHLA-A2とAIQ-HLA-A2との両方について弱く染色されることが示された(図1D)。これらの結果は、YG1由来のscFvがAIQ-HLA-A2複合体に特異的であることを示している。

【0409】

[実施例2]

AIQ-HLA-A2複合体へのYG1 scFv-Fcの特異的かつ高親和性の結合

YG1 scFvをさらに特徴付けるため、切り替え可能な酵母ディスプレイ/分泌系を使用して、YG1 scFv-Fc融合タンパク質を産生した(図2A)。融合タンパク質は、プロテインAレジンを使用して精製し、SDS-PAGEによって解析した。非還元条件下で、主なバンドはほぼ60、140、および260kDaで検出され、単量体

、二量体、および四量体の s c F v - F c タンパク質産生物のサイズに対応した (図 2 B)。還元すると、60 k D a のバンドの強度は増加し、260 k D a のバンドは消失して、単量体 s c F v - F c タンパク質産生物の予想される分子量と一致した。140 k D a のバンドの持続はおそらく、融合タンパク質のグリコシル化等の翻訳後修飾によるものである (Van Deventer et al., PROTEIN ENG DES SEL 28: 317 (2015) を参照)。

【0410】

フローサイトメトリーを使用して、O C I - A M L 3、すなわち N P M 1 c 変異を有する H L A - A 2 + A M L 細胞株 (Quentmeier et al., LEUKEMIA 19: 1760 (2005) を参照) ; O C I - A M L 2、すなわち野生型 N P M 1 a を有する H L A - A 2 + A M L 細胞株 ; T 2、すなわち野生型 N P M 1 を有する H L A - A 2 + リンパ芽細胞株 (Lor 10 ente et al., J BIOL CHEM 286: 38054 (2011) を参照) ; G M B、すなわち M y c および B c l 2 の過発現由来の H L A - A 2 + B 細胞白血病 / リンパ腫株 (Leskov et al., ONCOGENE 32: 1066 (2013)) ; および P C - 3、すなわち野生型 N P M 1 を有する H L A - A 2 - 前立腺がん細胞株 (Matsueda et al., PLOS ONE 7: e45756 (2012) を参照) を含む N P M 1 c および H L A - A 2 の陽性および陰性の細胞株のパネルにおける Y G 1 s c F v - F c タンパク質の A I Q - H L A - A 2 複合体への特異的結合を検証した。細胞を H L A - A 2 について染色した場合、予想されたように、O C I - A M L 3、O C I - A M L 2、T 2、および G M B 細胞は陽性であり、P C - 3 細胞は陰性であった (図 2 C)。融合タンパク質中の H A エピトープを検出するために、細胞を Y G 1 s c F v - F c 融合タンパク質および続いて P E 標識抗 H A 抗体で染色した場合 20 (図 2 A 参照)、ほとんどすべての O C I - A M L 3 細胞は陽性であったが、T 2、G M B、または P C - 3 細胞のいずれも、陽性でなかった (図 2 D)。さらに、O C I - A M L 2 細胞のいずれも、陽性でなかった (データは示していない)。したがって、Y G 1 s c F v は、N P M 1 c 変異を有するヒト H L A - A 2 + A M L 細胞上の A I Q - H L A - A 2 複合体に特異的に結合することができる。

【0411】

バイオレイヤー干渉法を使用して、A I Q - H L A - A 2 複合体に対する Y G 1 s c F v - F c の親和性を測定した。精製した Y G 1 s c F v - F c 融合タンパク質をビオチン化し、ストレプトアビジン (S A) バイオセンサーに捕捉した。A I Q - H L A - A 2 を添加すると、結合振幅は濃度依存的に増加した (図 2 E) 一方、結合振幅は増加する濃度の S L L - H L A - A 2 または H L A - A 2 複合体の添加によって顕著には変化しな 30 かった。会合および解離の速度論に基づいて、Y G 1 s c F v - F c と A I Q - H L A - A 2 の会合定数 (K_{on}) は $5.33 \pm 0.02 \times 10^4 M s^{-1}$ 、解離定数 (K_{off}) は $3.77 \pm 0.02 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、平衡解離定数 (K_D) は $7.07 \pm 0.08 nM$ であった。合わせて、これらの結果は、Y G 1 s c F v - F c 融合タンパク質が A I Q - H L A - A 2 複合体に高い特異性および親和性で結合することを示している。

【0412】

[実施例 3]

A I Q - H L A - A 2 複合体に特異的な C A R - T 細胞の生成

N P M 1 c C A R を構築するために、C D 8 ヒンジおよび膜貫通 (T M) ドメイン 40、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、および C D 3 活性化ドメイン、それに続く自己切断性の P 2 A および E G F P を含有する C A R 骨格にインフレームで Y G 1 s c F v をクローニングした (図 3 A および図 3 B、ならびに以下の配列の部)。対照として、C D 1 9 に特異的な C A R (C D 1 9 C A R) を発現するために同じ構造骨格を使用した。ヒト C D 8 + T 細胞はドナー末梢血単核細胞 (P B M C) から精製し、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 で 4 日間、活性化し、次いで形質導入しないか、または N P M 1 c C A R もしくは C D 1 9 C A R を発現するレンチウイルスを形質導入した。4 日後、形質導入した T 細胞を G F P + 細胞についての選別によって単離し、さらに 10 日間、増大させた。得られた T 細胞を、s c F v を認識する A F 6 4 7 標識抗ヒト I g G 重鎖および軽鎖抗体による染色によって、G F P および C A R の発現について解析した。図 3 C に示すように、N P M 50

1 c CARを発現するレンチウイルスを形質導入したT細胞は、GFPとscFvの両方について陽性であった一方、CD19 CARを発現するレンチウイルスを形質導入したT細胞はGFPについては陽性であったが、scFvについては弱い陽性のみであった。後者はおそらくCD19 scFvがマウスの配列からヒト化されていたためであろう（米国特許出願公開第2014/0271635号明細書を参照）。得られたNPM1c CAR-T細胞がAIQ-HLA-A2複合体を特異的に認識するか否かを判定するため、CAR-T細胞をビオチン化したAIQ-HLA-A2、SLL-HLA-A2、またはHLA-A2とインキュベートし、続いてストレプトアビジン-APCによって染色した。GFP⁺NPM1c CAR-T細胞はAIQ-HLA-A2複合体に特異的に結合したが、SLL-HLA-A2またはHLA-A2には結合しなかった（図3D）一方、非形質導入T細胞とCD19 CAR T細胞との両方は3種の複合体のいずれにも結合を示さなかった。これらの結果は、AIQ-HLA-A2複合体へのNPM1c-CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）の特異性を確認するものである。

10

【0413】

[実施例4]

*in vitro*におけるNPM1c CAR-T細胞によるヒトAML細胞の特異的殺滅

NPM1c CAR-T細胞の有効性及び特異性を検討するため、非形質導入T細胞およびNPM1c CAR-T細胞（YG1 scFvを含む）を、OCI-AML3、GMB、およびPC-3腫瘍細胞と異なるエフェクター：標的（E：T）比で24時間、共培養した。T細胞と腫瘍細胞との相対的割合は、CD8とCD33（OCI-AML3について）、CD19（GMBについて）、またはmCherry（PC-3について）を染色するフローサイトメトリーによって定量化した。図4Aおよび図4Bに示すように、NPM1c CAR-T細胞はHLA-A2⁺NPM1c⁺OCI-AML3細胞を用量依存的に殺滅したが、HLA-A2⁺NPM1c⁻GMB細胞またはHLA-A2⁻NPM1c⁻PC-3細胞をE：T比に関わらず殺滅しなかった。これと一致して、GMBまたはPC-3細胞と比較してOCI-AML3細胞と共培養した場合、非形質導入T細胞と比較して有意により高いパーセンテージのNPM1c CAR-T細胞がIFN- γ を発現した（図4C、左パネルのバーを参照（陰影を付けたバーの左の組がNPM1c CAR-T細胞に相当し、陰影を付けたバーの右の組が非形質導入T細胞に相当する）。同様に、OCI-AML3細胞と共培養した場合、非形質導入T細胞と比較して有意により高いパーセンテージのNPM1c CAR-T細胞がIL-2を発現したが、パーセンテージはずっと低かった（<2%）（図4C、右パネルのバーを参照（陰影を付けたバーの左の組がNPM1c CAR-T細胞に相当し、陰影を付けたバーの右の組が非形質導入T細胞に相当する）。これらの結果は、NPM1c CAR-T細胞が*in vitro*でHLA-A2⁺NPM1c⁺AML細胞を特異的に殺滅することができることを示している。OCI-AML3標的細胞と共培養した場合のIL-2を発現する極めて少ない割合（<2%）のNPM1c CAR-T細胞は、OCI-AML3細胞上に存在するNPM1cペプチド-HLA-A2複合体の密度が低いことによるものである。この可能性を支持して、Watanabeらは、T細胞のサイトカイン産生を誘導するために必要な標的抗原の密度は、CAR媒介細胞溶解を刺激するために必要な標的抗原の密度よりずっと高いことを示した。CD20特異的CAR-T細胞は、最小密度のCD20（約200分子/細胞）で標的細胞を溶解することができるが、サイトカインの産生にはより高い密度のCD20（約5,000分子/細胞）が必要であった（Watanabe et al., JIMMUNOL 194: 911 (2015)）。最近、WalkerらはNalm6細胞を使用してCAR-T細胞を活性化するために必要な抗原の密度を検討し、CAR-T細胞は最小のCD20発現で標的細胞を溶解し、あまり高くない抗原密度でIFN- γ の産生を誘導することができるが、IFN- γ の産生と比較してIL-2の産生には有意により高いCD20密度の閾値が必要であることを見出した（同文献）。OCI-AML3細胞上のAIQ-HLA-A2の密度は未知であるが、がん細胞上のペプチド-MHC I複合体の密度は通常、100~数千分子の範囲であり（Dubrovsky et al., ONCOIMMUNOLOGY

20

30

40

50

5: e1049803 (2016))、これはCAR-T細胞の細胞溶解活性を誘発するためには十分であるが、CAR-T細胞のサイトカイン産生を誘発するには十分ではないであろう (Watanabe et al., FRONT IMMUNOL 9: 2486 (2018))。この点に関して、ペプチド-MHC複合体を標的とするCAR-T細胞を使用すれば、サイトカイン放出症候群のリスクは、例えば高度に発現されるTAAよりもおそらく低いであろう。

【0414】

標的細胞による刺激の後のNPM1c CAR-T細胞によるより広い範囲のサイトカインの放出を評価するため、Quantibody Human Cytokine Arrayを使用して、4名の健康なドナーから調製したNPM1c CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む) または非形質導入T細胞と、OCI-AML3標的細胞との共培養からの上清中の20種のヒトサイトカインおよびケモカインの分泌を定量的に測定した。非形質導入T細胞と比較して、NPM1c CAR-T細胞からの上清において、GM-CSF (ドナー4名中4名)、IL-13 (ドナー4名中4名)、MIP-1 (ドナー4名中4名)、IL-8 (ドナー4名中4名)、IFN- (ドナー4名中3名)、MIP-1 (ドナー4名中3名)、RANTES (ドナー4名中3名)、IL-2 (ドナー4名中2名)、MCP-1 (ドナー4名中2名)の分泌の有意な増加が見出された (図4D)。

【0415】

NPM1c⁺HLA-A2⁺標的細胞がNPM1c CAR-T細胞の増殖を刺激するか否かを評価するため、NPM1c CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む) または非形質導入T細胞をOCI-AML3細胞と5日間、共培養し、T細胞の数およびKi-67の発現をフローサイトメトリーによって定量化した。プレジジョンカウントビーズを使用するフローサイトメトリーによって決定して、NPM1c CAR-T細胞の絶対数は非形質導入T細胞の絶対数より有意に高かった (図4E)。分子内Ki-67染色の平均蛍光強度 (MFI) によって決定して、NPM1c CAR-T細胞において、非形質導入T細胞と比較して増加したKi-67の発現が観察された (図4F)。これらの結果は、NPM1c⁺HLA-A2⁺標的細胞に応答して増殖するNPM1c CAR-T細胞の能力を示している。

【0416】

NPM1c⁺HLA-A2⁺AML細胞のターゲティングにおけるNPM1c CAR-T細胞の特異性をさらに検証するために、HLA-A2⁺のOCI-AML2細胞およびHLA-A2⁻のPC-3細胞にレンチウイルスを形質導入して、NPM1cを安定的に発現するようにした (データは示していない)。外因性NPM1c発現に続いて、HLA-A2⁺のOCI-AML2細胞はYG1 scFv-Fcについて陽性染色され (データは示していない)、NPM1c CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む) によってE:T比依存的に殺滅された (図4G)。しかし、NPM1cを発現するHLA-A2⁻のPC-3細胞はYG1 scFv-Fcによって染色されず (データは示していない)、非形質導入T細胞と比較していずれのE:T比でもNPM1c CAR-T細胞 (YG1 scFvを含む) によって殺滅されなかった (図4H)。

【0417】

さらに、NPM1c CAR-T細胞の抗原特異性を実証するために、T2細胞に異なるペプチドをロードした。T2細胞はHLA-A2⁺であるが、抗原プロセッシングに関連する輸送体 (TAP) を欠いている。したがって、T2細胞表面上のHLA-A2分子の多くは内因性ペプチドがロードされていないが、外因性ペプチドをロードすることができる (例えば、Hosken, N., et al., SCIENCE 248:367 (1990); Bossi, G. et al., ONCOIMMUNOLOGY 2:e26840 (2013)を参照)。T2細胞に0.1 μM ~ 1 μM ~ 10 μMの範囲の異なる濃度のNPM1cペプチド (AIQ) またはNY-ESO-1ペプチド (SLL) をパルス処理した。AIQペプチドをパルス処理したがSLLペプチドをパルス処理していないT2細胞を、YG1 scFv-Fcで染色した (図4I)。これと一致して、NPM1c CAR-T (YG1 scFvを含む) はAIQパルス処

10

20

30

40

50

理した T2 細胞をペプチド濃度依存的に殺滅したが、SLL パルス処理した T2 細胞を殺滅しなかった (図 4 J)。これらの結果は、NPM1c CAR-T 細胞認識および細胞表面上に NPM1c-HLA-A2 複合体を有する標的細胞の殺滅の特異性をさらに支持している。

【0418】

[実施例 5]

NPM1c CAR-T 療法は白血病負荷を低減し、生存期間を延長する

in vivo における NPM1c CAR-T 細胞の抗腫瘍活性を試験するため、ルシフェラーゼを発現する OCI-AML3 腫瘍細胞 (マウス 1 匹あたり 1×10^6 個、図 5 A) を NSG マウスに静脈内注射した。注射の 4 日後に生物発光イメージング (BLI) によって生着を確認した後、マウスに CAR-T または対照の非形質導入 T 細胞 (マウス 1 匹あたり 1×10^7 個) を単回静脈内注射した。3 日ごとに BLI を使用して白血病負荷をモニターした。NPM1c CAR-T 細胞 (YG1 scFv を含む) で処置したマウスは白血病負荷の顕著な低減を示し、非形質導入 T 細胞で処置したマウスと比較して生存期間の延長をもたらされた (図 5 B および 図 5 C)。 *in vivo* における NPM1c CAR-T 細胞の殺滅の特異性を試験するため、ルシフェラーゼを発現するヒト HLA-A2⁺CD19⁺GMB 細胞 (Leskov et al., ONCOGENE 32: 1066 (2013); Pallasch et al., CELL 156: 590 (2014)) を NSG マウスに注射した。腫瘍を担持するマウスに、単回用量の NPM1c CAR-T 細胞 (YG1 scFv を含む)、非形質導入 T 細胞、または CD19 CAR-T 細胞を投与した。非形質導入 T 細胞と比較して、NPM1c CAR-T 細胞はリンパ腫負荷を低減しない、または生存期間を延長しなかった一方、CD19 CAR-T 細胞はリンパ腫負荷を大きく低減し、生存期間を延長した (図 5 D および 図 5 E)。これらの結果は、NPM1c CAR-T 細胞が HLA-A2⁺であり、NPM1c⁺である AML を *in vivo* で殺滅することができるが、NPM1c の変異がない HLA-A2⁺ のリンパ腫細胞を殺滅しないことを示しており、優れた特異性を実証している。

【0419】

OCI-AML2 細胞は OCI-AML3 細胞と同様の背景を有しているが、野生型 NPM1 タンパク質を発現する (例えば van der Lee, D. I. et al., J CLIN INVEST 129 774 (2019) を参照)。NPM1c CAR-T 細胞の特異性の陰性対照として、ルシフェラーゼを発現する OCI-AML2 細胞 (マウス 1 匹あたり 1×10^6 個) を NSG マウスに注射し、続いて 4 日後に NPM1c CAR-T (YG1 scFv を含む) または対照の非形質導入 T 細胞 (マウス 1 匹あたり 1×10^7 個) を静脈内単回注射した。図 5 F に示すように、NPM1c CAR-T 細胞は、PBS 対照または非形質導入 T 細胞と比較して、OCI-AML3 白血病負荷を効果的に低減した。しかし、NPM1c CAR-T 細胞は、非形質導入 T 細胞と比較して、NSG マウスにおける OCI-AML2 白血病負荷も低減せず、処置したマウスの生存期間も延長しなかった (図 5 G ~ 図 5 H)。これらの結果は、NPM1c CAR-T 細胞が NPM1c 陽性 AML 細胞を特異的に殺滅するが、NPM1c 陰性 AML 細胞を殺滅しないことをさらに支持している。

【0420】

[実施例 6]

NPM1c CAR-T 療法は異なる組織において白血病細胞数を低減する

NPM1c CAR-T 細胞の抗白血病活性を検討するため、CAR-T 細胞の移入の 18 日後に、CAR-T 細胞と異なる組織中の白血病細胞をフローサイトメトリーによって解析した。図 6 A に示すように、白血病負荷は T 細胞の移入の日 (OCI-AML3 の注射の 4 日後) には同様であったが、T 細胞の移入の 18 日後までに白血病負荷は NPM1c CAR-T (YG1 scFv を含む) を受けたマウスにおいて、非形質導入 T 細胞を受けたマウスより有意に低かった。18 日目に血液、脾、骨髄、および肝を収集し、単一細胞懸濁液を調製して、マウス CD45 (mCD45)、ヒト CD45 (hCD45)、hCD8、hCD33、hPD-1、および hTim-3 について染色した。図 6 B

~ 6 Cに示すように、hCD45⁺細胞は、hCD8⁺T細胞およびhCD33⁺白血病細胞からなっていた。hCD33⁺白血病細胞の数およびパーセンテージは、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)で処置したマウスの4種すべての組織において、非形質導入T細胞で処置したマウスの組織におけるよりも有意に少なかった(図6Dおよび図6E)。これと一致して、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)で処置したマウスの4種すべての組織において、非形質導入T細胞で処置したマウスの組織よりも高いパーセンテージのhCD8⁺T細胞が存在していた。さらに、hCD33⁺白血病細胞に対するhCD8⁺T細胞の比は、NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)で処置したマウスのすべての組織において、非形質導入T細胞を投与したマウスよりも有意に高かった(図6F)。ヒトCD8⁺T細胞を、PD-1およびTim-3の発現についても解析した(図6C)。PD-1を発現したhCD8⁺T細胞のパーセンテージは血液、脾、骨髄、および肝の間で有意に変動したが、非形質導入T細胞を投与したマウス、またはNPM1c CAR-T細胞を投与したマウスの間の同じ組織では有意な相違はなかった(図6G)。興味あることに、Tim-3を発現したT細胞のパーセンテージは、NPM1c CAR-T細胞を投与したマウスの脾および骨髄においては有意に高かったが、パーセンテージは低かった(<5%)(図6H)。これらの結果は、図5Bおよび6Aにおける白血病負荷の生物発光イメージング解析に基づく結果と一致している。

10

【0421】

NPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)もしくは非形質導入T細胞、またはPBSを注射した30日後に生存しているマウスの骨髄における白血病負荷をさらに解析した(マウスは図5Fで代表され、実施例5に記載したマウスである)。NPM1c CAR-Tで処置した4匹のマウスのうち3匹の骨髄ではOCI-AML3白血病細胞はほぼ完全に消失していた(図6I)一方、骨髄中にヒトT細胞の大きな集団が検出された。対照的に、非形質導入T細胞で処置した生存している1匹のマウス(他のマウスは30日以内に死亡した)およびPBSで処置した生存している2匹のマウス(他のマウスは30日以内に死亡した)の骨髄において多数の白血病細胞が検出された(図6I)。したがって、NPM1c CAR-T細胞は骨髄中で増大してOCI-AML3細胞を殺滅することができるようであり、疾患の進行を有意に制御する。

20

【0422】

[実施例7]

NPM1c CAR-T細胞は*in vitro*および*in vivo*において初代ヒトAML芽細胞を効果的に殺滅する

NPM1c CAR-T細胞がNPM1c⁺HLA-A2⁺初代AML芽細胞を殺滅するか否かをさらに評価した。3名の異なるドナーからのNPM1c⁺HLA-A2⁺初代AML芽細胞を異なるE:T比でNPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)とインキュベートし、24時間後にプレシジョンカウントビーズを含むフローサイトメトリーによってAML芽細胞の数を定量化した。図7Aに示すように、殺滅活性は試料の間で変動したが、3種すべての初代AML試料はNPM1c CAR-T細胞によってE:T比依存的に効果的に殺滅された。対照的に、2名の異なるドナーからのヒトHLA-A2⁺CD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)はYG1 scFv-Fcによって染色されず(図7Bおよび図7C)、非形質導入T細胞と比較して、NPM1c CAR-T細胞によって殺滅されなかった(図7Dおよび図7E)。

30

40

【0423】

患者由来の異種移植におけるNPM1c CAR-T療法の有効性を評価するため、NSGSマウスにHLA-A2⁺NPM1c⁺ヒト初代AML芽細胞を注射した。ヒト初代AMLの生着効率を改善するため、既に述べたように、初代AMLの注射の24時間前に、ヒトIL-3およびGM-CSFをコードする100μgのDNAプラスミドをNSGSマウスに水力学的に注射した(例えばChen, Q et al (2009) PNAS 106:21783を参照)。AML負荷は、尾静脈の採血およびヒトCD45⁺CD8⁻細胞をアッセイする

50

フローサイトメトリーによって末梢血中で定量化した。AML芽細胞が注射の2週後に血液中で検出され(図7F)、マウスにNPM1c CAR-T細胞(YG1 scFvを含む)または非形質導入T細胞を注射した。9日ごとに血液中のAML芽細胞のレベルをモニターした。図7Fおよび図7Gに示すように、AML芽細胞のレベルは、T細胞の注射の9日後と18日後の両方で、NPM1c CAR-T細胞で処置したマウスにおいて、非形質導入T細胞と比較して低減していた。差異は18日目までに有意となった。これらの結果は、NPM1c CAR-T細胞が患者由来の異種移植モデルにおいても初代HLA-A2⁺NPM1c⁺AML芽細胞の殺滅に効果的であることを示している。

【0424】

参考文献

【0425】

【表3-1】

¹ Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T., Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *NAT REV CANCER* **14** 135 (2014).

² Srivastava, S. & Riddell, S. R., Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Challenges to Bench-to-Bedside Efficacy. *J IMMUNOL* **200** 459 (2018).

³ Blankenstein, T., Leisegang, M., Uckert, W. & Schreiber, H., Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *CURR OPIN IMMUNOL* **33** 112 (2015).

⁴ Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D., Neoantigens in cancer immunotherapy. *SCIENCE* **348** 69 (2015).

⁵ van der Lee, D. I. *et al.*, Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia. *J CLIN INVEST* **129** 774 (2019).

⁶ Verdegaal, E. M. *et al.*, Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *NATURE* **536** 91 (2016).

⁷ Blankenstein, T., Leisegang, M., Uckert, W. & Schreiber, H., Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *CURR OPIN IMMUNOL* **33** 112 (2015).

⁸ Thomas, D. & Majeti, R., Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *BLOOD* **129** 1577 (2017).

⁹ Dombret, H. & Gardin, C., An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *BLOOD* **127** 53 (2016).

¹⁰ Dohner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D., Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **373** 1136 (2015).

¹¹ Ossenkoppele, G. J., Janssen, J. J. & van de Loosdrecht, A. A., Risk factors for relapse after allogeneic transplantation in acute myeloid leukemia. *HAEMATOLOGICA* **101** 20 (2016).

¹² Ley, T. J. *et al.*, Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **368** 2059 (2013).

¹³ Alexandrov, L. B. *et al.*, Signatures of mutational processes in human cancer. *NATURE* **500** 415 (2013).

¹⁴ Kandoth, C. *et al.*, Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *NATURE* **502** 333 (2013).

¹⁵ Papaemmanuil, E. *et al.*, Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374** 2209 (2016).

¹⁶ Falini, B. *et al.*, Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* **352** 254 (2005).

¹⁷ Greiner, J. *et al.*, Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *BLOOD* **120** 1282 (2012).

¹⁸ Greiner, J. *et al.*, Immune responses against the mutated region of cytoplasmatic NPM1

【0426】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

might contribute to the favorable clinical outcome of AML patients with NPM1 mutations (NPM1mut). *BLOOD* **122** 1087 (2013).

¹⁹ Chao, G. *et al.*, Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *NAT PROTOC* **1** 755 (2006).

²⁰ Choo, J. A., Liu, J., Toh, X., Grotenbreg, G. M. & Ren, E. C., The immunodominant influenza A virus M158-66 cytotoxic T lymphocyte epitope exhibits degenerate class I major histocompatibility complex restriction in humans. *J VIROL* **88** 10613 (2014).

²¹ Van Deventer, J. A., Kelly, R. L., Rajan, S., Wittrup, K. D. & Sidhu, S. S., A switchable yeast display/secretion system. *PROTEIN ENG DES SEL* **28** 317 (2015).

²² Quentmeier, H. *et al.*, Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *LEUKEMIA* **19** 1760 (2005).

²³ Lorente, E., Garcia, R. & Lopez, D., Allele-dependent processing pathways generate the endogenous human leukocyte antigen (HLA) class I peptide repertoire in transporters associated with antigen processing (TAP)-deficient cells. *J BIOL CHEM* **286** 38054 (2011).

²⁴ Leskov, I. *et al.*, Rapid generation of human B-cell lymphomas via combined expression of Myc and Bcl2 and their use as a preclinical model for biological therapies. *ONCOGENE* **32** 1066 (2013).

²⁵ Matsueda, S. *et al.*, Identification of prostate-specific G-protein coupled receptor as a tumor antigen recognized by CD8(+) T cells for cancer immunotherapy. *PLOS ONE* **7** e45756 (2012).

²⁶ Jennifer, B., Carl, H. J., Andreas, L., Marcela, M., John, S., Treatment of cancer using humanized anti-CD19 chimeric antigen receptor: U S, 20140271635A1[P]. 2014-09-18.

²⁷ Pallasch, C. P. *et al.*, Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *CELL* **156** 590 (2014).

²⁸ Shah, N. N. & Fry, T. J., Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *NAT REV CLIN ONCOL* **16** 372 (2019).

²⁹ Salmikangas, P., Kinsella, N. & Chamberlain, P., Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR T-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry? *Pharm Res* **35** 152 (2018).

³⁰ Brudno, J. N. & Kochenderfer, J. N., Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *BLOOD REV* **34** 45 (2019).

³¹ Gill, S. *et al.*, Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *BLOOD* **123** 2343 (2014).

³² Kenderian, S. S. *et al.*, CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *LEUKEMIA* **29** 1637 (2015).

³³ Uhlen, M. *et al.*, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *SCIENCE* **347** 1260419 (2015).

³⁴ Watanabe, K. *et al.*, Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J IMMUNOL* **194** 911 (2015).

³⁵ Dubrovsky, L. *et al.*, T cell receptor mimic antibodies for cancer therapy. *ONCOIMMUNOLOGY* **5** e1049803 (2016).

³⁶ Watanabe, K., Kuramitsu, S., Posey, A. J. & June, C. H., Expanding the Therapeutic Window for CAR T Cell Therapy in Solid Tumors: The Knowns and Unknowns of CAR T Cell Biology. *FRONT IMMUNOL* **9** 2486 (2018).

³⁷ Zhang, J. & Wang, L., The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol Cancer Res Treat* **18** 1078098716 (2019).

³⁸ Morris, E. C. & Stauss, H. J., Optimizing T-cell receptor gene therapy for hematologic

【 0 4 2 7 】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

malignancies. *BLOOD* **127** 3305 (2016).

³⁹ Amir, A. L. *et al.*, PRAME-specific Allo-HLA-restricted T cells with potent antitumor reactivity useful for therapeutic T-cell receptor gene transfer. *CLIN CANCER RES* **17** 5615 (2011).

⁴⁰ Provasi, E. *et al.*, Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *NAT MED* **18** 807 (2012).

⁴¹ Bendle, G. M. *et al.*, Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *NAT MED* **16** 565, 1p (2010).

⁴² van Loenen, M. M. *et al.*, Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** 10972 (2010).

⁴³ Vivier, E. *et al.*, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *SCIENCE* **331** 44 (2011).

⁴⁴ Shah, N. N. & Fry, T. J., Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *NAT REV CLIN ONCOL* **16** 372 (2019).

⁴⁵ Hermanson, D. L. *et al.*, Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Treatment of Ovarian Cancer. *STEM CELLS* **34** 93 (2016).

⁴⁶ Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarty, B. S. & Kaufman, D. S., Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *CELL STEM CELL* **23** 181 (2018).

10

【 0 4 2 8 】

20

付録 1

特異的抗 A I Q D L C L A V : H L A - A 2 抗体を選択のためのステップの例 (いずれの理論にも縛られないが、実施例 1 に基づく) :

第 1 のラウンドの選択 :

ビオチン化 A I Q - H L A - A 2 抗原に陽性に結合する酵母集団の磁気選別 (M A C S) による選択。

選択の第 2 ラウンド :

他のペプチド - H L A - A 2 複合体抗原に結合する可能性のある選別された酵母細胞を除外するため、対照ペプチド (S L L) - H L A - A 2 複合体を使用して第 1 のステップで選別された酵母細胞を染色し、 S L L - H L A - A 2 抗原に結合できなかった酵母細胞を磁気選別によって採取する。

30

選択の第 3 ラウンド :

選択の第 1 および第 2 のラウンドでは、 A I Q - H L A - A 2 複合体に結合することができる酵母細胞を 1×10^{10} 酵母細胞まで大まかに富化することができる。図 1 B # 1 に示すように、2 ラウンドの M A C S 選別の後で、 A I Q - H A L - A 2 複合体抗原および s c F v の発現について二重陽性に染色された細胞は僅かに 3 . 6 4 % であった。したがって、第 3 のラウンドの選択において、これらの二重陽性の酵母細胞の 3 . 6 4 % を、フローサイトメトリー選別によって選別することができる。

選択の第 4 のラウンド :

図 1 B # 2 に示すように、第 3 の選択によって、 A I Q - H A L - A 2 複合体抗原および s c F v の発現について二重陽性に染色される酵母集団をさらに富化 (4 1 . 4 %) することができる。したがって、第 4 のラウンドの選択において、これらの二重陽性の酵母細胞の 4 1 . 4 % は、フローサイトメトリー選別によってさらに選別することができる。

40

選択の第 5 ラウンド :

図 1 c # 1 ~ # 4 に示すように、第 4 の選択によって、 A I Q - H A L - A 2 複合体抗原および s c F v の発現について二重陽性に染色される酵母集団をさらに富化 (4 5 . 1 %) することができる。しかし、 G I L - H A L - A 2 または S L L - H L A - A 2 複合体および s c F v の発現について二重陽性に染色される酵母細胞の少量の分画があった。したがって、第 5 のラウンドの選択では、他のペプチド - H L A - A 2 複合体抗原に結合する可能性のある酵母細胞をさらに除外するために、 S L L - H L A - A 2 複合体を使用

50

して第4ラウンドの選択で選別された酵母細胞を染色することができ、s c F vは陽性であるがS L L - H L A - A 2抗原には陰性染色される酵母細胞を選別することができる(図1B#3)。

選択の第6のラウンド：

図1C#7~#9に示すように、第5の選択によって、A I Q - H A L - A 2複合体抗原およびs c F vの発現について二重陽性に染色される酵母集団をさらに富化(55.8%)し、対照ペプチドであるG I LまたはS L L - H L A - A 2複合体に陽性に結合する酵母細胞のパーセンテージを減少させることができる。予期しないことに、本発明者らは、A I Q - H L A - A 2について陽性染色された酵母細胞の大部分がH L A - A 2タンパク質についても陽性染色される(28.1%、図1C#6)ことを見出した。第6の選択

10

選択の第7のラウンド：

図1C#14に示すように、第6の選択によって、A I Q - H A L - A 2複合体抗原に高親和性で結合する酵母集団(74.9%)が富化された。しかし、H A L - A 2抗原に高親和性で結合する酵母集団(76.7%)も富化され、これは、選別された酵母細胞のほとんどすべてがH L A - A 2単独に結合できることを示していた。したがって、選択の第7のラウンドでは、H L A - A 2抗原に陰性結合する酵母細胞(約0.5%)を選別することができる。選択の第7のラウンドの後、本発明者らは、A I Q - H L A - A 2について陽性染色される酵母集団が富化された(22.8%、図1C#19)一方、H L A -

20

選択の第8のラウンド：

A I Q - H L A - A 2複合体について陽性染色される酵母集団をさらに富化するため、図1B#6に示すように、A I Q - H L A - A 2染色陽性の酵母細胞を第8の選択でさらに選別することができる。この選択の後、A I Q - H L A - A 2複合体に高親和性で結合する酵母細胞の69.5%までを富化した(図1C#24)が、H L A - A 2抗原単独に陽性結合するこれらの酵母細胞の半分(31.3%、図1C#21)がまだ存在していた。

選択の第9のラウンド：

H L A - A 2抗原単独に結合することができる酵母集団をさらに除外するため、H L A - A 2抗原単独について陰性染色された酵母細胞をさらに選別することができる(図1B#7)。この選択の後、A I Q - H L A - A 2複合体に高親和性で結合する酵母細胞を高度に富化し(60.6%、図1C#29)、酵母細胞の2.87%だけ(図1C#26)がH L A - A 2抗原単独に結合した。

30

【0429】

配列

【0430】

40

50

【表 4 - 1】

| 配列番号 | 説明 | 配列 |
|------|--------------------------------|---|
| 1 | NPM1c の白血病特異的ネオ抗原エピトープ | AIQDLCLAV |
| 2 | YG1 scFv アミノ酸配列 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKSGILGTAAASGSSGGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPTTLLPFDYWGQGLTVTVSS |
| 3 | YG1 scFv VL アミノ酸配列 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKSGILGTAA |
| 4 | YG1 scFv リンカーアミノ酸配列 | SGSSGGSSSG |
| 5 | YG1 scFv VH アミノ酸配列 | AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPTTLLPFDYWGQGLTVTVSS |
| 6 | YG1 scFv VL CDR1 アミノ酸配列 (IMGT) | QSISSY |
| 7 | YG1 scFv VL CDR2 アミノ酸配列 (IMGT) | AAS |
| 8 | YG1 scFv VL CDR3 アミノ酸配列 (IMGT) | QCSYSTPLT |
| 9 | YG1 scFv VH CDR1 アミノ酸配列 (IMGT) | GFTFSSYA |
| 10 | YG1 scFv VH CDR2 アミノ酸配列 (IMGT) | ISGSGGST |
| 11 | YG1 scFv VH CDR3 アミノ酸配列 (IMGT) | ARLGYPTTLLPFDY |

10

20

30

40

【 0 4 3 1 】

50

【表 4 - 2】

| | | | |
|----|------------------------------|--|----|
| 12 | YG1 scFv 核酸配列 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAG GGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CGCTCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATC CGGAATTCTAGGTAATACTGCGCTAGTGGTAGTAGTGGT GGCAGTAGCAGTGGTGGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTGGGTTAC CCTACTACTACCCTACTACCCTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCCTGGTCACTGICTCCAGT | 10 |
| 13 | YG1 scFv VL 核酸配列 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAG GGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CGCTCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATC CGGAATTCTAGGTAATACTGCGCT | 20 |
| 14 | YG1 scFv リンカー核酸配列 | AGTGGTAGTAGTGGTGGCAGTAGCAGTGGT | |
| 15 | YG1 scFv VH 核酸配列 | GCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGG TAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT GTATTACTGTGCGAGGCTGGGTTACCCTACTACTACCCTAC TACCCTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACTGTC TCCAGT | 30 |
| 16 | YG1 scFv VL CDR1 核酸配列 (IMGT) | CAGAGCATTAGCAGCTAT | 40 |

【 0 4 3 2 】

【表 4 - 3】

| | | | |
|----|---------------------------------------|--|----|
| 17 | YG1 scFv VL CDR2 核酸配列 (IMGT) | GCTGCATCC | |
| 18 | YG1 scFv VL CDR3 核酸配列 (IMGT) | CAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACG | |
| 19 | YG1 scFv VH CDR1 核酸配列 (IMGT) | GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCC | 10 |
| 20 | YG1 scFv VH CDR2 核酸配列 (IMGT) | ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA | |
| 21 | YG1 scFv VH CDR3 核酸配列 (IMGT) | GCGAGGCTGGGTTACCCTACTACTACCCTACTACCCTTTGATTAC | |
| 22 | NPM1c CAR アミノ酸配列 (YG1 scFv を含む) | MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKSGILGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPTTLLPFDYWGQGTILVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDGLVNRIELKGIKDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK | 20 |
| 23 | NPM1c CAR 中のリーディング配列のアミノ酸配列 | MALPVTALLLPLALLLHAARP | 30 |
| 24 | NPM1c CAR 中の YG1 scFv のアミノ酸配列 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTIISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKSGILGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPTTLLPFDYWGQGTILVTVSS | 40 |

【 0 4 3 3 】

【表 4 - 4】

| | | |
|----|---------------------------------------|---|
| 25 | NPM1c CAR 中の C8 ヒンジおよび膜貫通領域のアミノ酸配列 | TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC |
| 26 | NPM1c CAR 中の 4-1BB シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列 | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL |
| 27 | NPM1c CAR 中の CD3-ゼータシグナル伝達ドメインのアミノ酸配列 | RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR |
| 28 | NPM1c CAR 中の P2A 自己切断ペプチドのアミノ酸配列 | ATNFSLKQAGDVEENPGP |
| 29 | NPM1c CAR 中の EGFP 領域のアミノ酸配列 | MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHD FFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKDTLVNRIE LKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK |

10

20

【 0 4 3 4 】

30

40

50

【表 4 - 5】

| | | |
|----|------------------------------------|---|
| 30 | NPM1c CAR 核酸配列(YG1 scFv を含む) | ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCAC GCCGCTCGGCCCACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATT AGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG CTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCTCACCATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CGCTCACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATCCGGAATTCT AGGTACTACTGCCGCTAGTGGTAGTAGTGGTGGCAGTAGCAGTGGTGGC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GGCTGGGTACCCCTACTACTACCCTACTACCCTTTGATTACTGGGGCCAA GGTACCCTGGTCACTGTCTCCAGTACCACTACCCAGCACCAGGGCCAC CCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATAACCCGGGGTCTTGACT TCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTC CTGCTGCTTTCCTCGTGCATCACTCTTACTGTAAAGCGCGTCCGAAGAA GAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAGAAAGCGG GCTGCGAAGTGGCGGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTA CAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAG AGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAA TGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAAGAAATCCCAAGAGGGCCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGA AAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCC TGCCGCTCGGGGATCCGGCGCAACAACTTCTCTGCTGAAACAAGC CGGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACCGATGGTGGAGCAAGGGCGAGGA GCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC TACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCG TGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC AGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGG CAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGC CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACC TGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCAT GGACGAGCTGTACAAGTGA |
|----|------------------------------------|---|

10

20

30

40

【 0 4 3 5】

【表 4 - 6】

| | | |
|----|-------------------------------------|---|
| 31 | NPM1c CAR 中のリーディング配列の核酸配列 | ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCT TCTGCTCCACGCCGCTCGGCC |
| 32 | NPM1c CAR 中の YG1 scFv の核酸配列 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAG AGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTG CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA AGATTTTGCAACTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CGCTCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATC CGGAATTCTAGGTACTACTGCCGCTAGTGGTAGTAGTGGT GGCAGTAGCAGTGGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTGGGTAC CCTACTACTACCCTACTACCCTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCCTGGTCACTGTCTCCAGT |
| 33 | NPM1c CAR 中の CD8 ヒンジおよび膜貫通領域の核酸配列 | ACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGT AGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATAACCCGGGGTCTTG ACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGT ACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGT |
| 34 | NPM1c CAR 中の 4-1BB シグナル伝達ドメインの核酸配列 | AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAAC CCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGC GAACTG |
| 35 | NPM1c CAR 中の CD3-ゼータシグナル伝達ドメインの核酸配列 | CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACA AGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGG TCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGG ACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAA TCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAG ATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAAC GCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGAC TCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACAT GCAGGCCCTGCCGCTCGG |
| 36 | NPM1c CAR 中の P2A 自己切断ペプチドの核酸配列 | GCAACAACTTCTCTCTGCTGAAACAAGCCGGAGATGTCTG AAGAGAATCCTGGACCG |

10

20

30

40

【 0 4 3 6 】

50

【表 4 - 7】

| | | | |
|----|---------------------------------|---|----|
| 37 | NPM1c CAR 中の EGFP 領域の核酸配列 | <p>ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAA GTTACAGCGTGTCGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC GGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGC AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGT CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATAACAAC AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA</p> | 10 |
| 38 | ヒト IgG1 | <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | 20 |
| 39 | ヒト IgG4 (末端 K 不在) | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG-</p> | 30 |
| 40 | ヒト IgG4 単一変異体 (S228P) (末端 K 不在) | <p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCP<u>P</u>CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG-</p> | 40 |

【 0 4 3 7 】

【表 4 - 8】

| | | |
|----|---|--|
| 41 | ヒト IgG4 二重変異体 (S228P) (L235E) (末端 K 不在) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPEF E GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG- |
| 42 | ヒト IgG4 二重変異体 (S228P) (L235A) (末端 K 不在) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPEF A GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG- |
| 43 | CD20 アミノ酸配列 | MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQ SFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVW YPLWGGIMYIISGSLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAI SGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPS EKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWK RTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDI EIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP |
| 44 | FLAG | DYKDDDDDK |
| 45 | ポリヒスチジン (6-His) | HHHHHH |
| 46 | ヘマグルチニン (HA) | YPYDVPDYA |
| 47 | HCDR1.1 (抗 CD3) アミノ酸配列 | GYTFTRYTMH |
| 48 | HCDR1.2 (抗 CD3) アミノ酸配列 | RYTMH |
| 49 | HCDR2 (抗 CD3) アミノ酸配列 | YINPSRGYTNYNQKFKD |
| 50 | HCDR3 (抗 CD3) アミノ酸配列 | YYDDHYCLDY |
| 51 | LCDR1 (抗 CD3) アミノ酸配列 | RASSSVSYMN |
| 52 | LCDR2 (抗 CD3) アミノ酸配列 | DTSKVAS |
| 53 | LCDR3 (抗 CD3) アミノ酸配列 | QQWSSNPLT |

10

20

30

40

【 0 4 3 8 】

50

【表 4 - 9】

| | | |
|----|---|--|
| 54 | ヒト野生型ヌクレオフォスミン(アミノ酸配列 - 受託番号 NM_002520) | MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEH QLSLRTVSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVTLATLKMS VQPTVSLGGFEITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAES EDEEEEDVKLLSISGKRSAPGGGSKVPQKKVKLAADEDDEDD DDEEDDDEDDDDDDDFDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKS NQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKKQEKTPKTPKGPSSVEDIKAK MQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLWQWR KSL |
| 55 | ヒト野生型ヌクレオフォスミンのC末端(アミノ酸配列) | MTDQEAIQDLWQWRKSL |
| 56 | 変異体 <i>NPM1c</i> 遺伝子によってコードされるヒトヌクレオフォスミン(アミノ酸配列) | MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEH QLSLRTVSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVTLATLKMS VQPTVSLGGFEITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAES EDEEEEDVKLLSISGKRSAPGGGSKVPQKKVKLAADEDDEDD DDEEDDDEDDDDDDDFDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKNAQKS NQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKKQEKTPKTPKGPSSVEDIKAK MQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLCLAVE EVSLRK |
| 57 | 変異体 <i>NPM1c</i> 遺伝子によってコードされるヒトヌクレオフォスミンのC末端(アミノ酸配列) | MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK |
| 58 | リンカー | (Gly4Ser)1 |
| 59 | リンカー | (Gly4Ser)2 |
| 60 | リンカー | (Gly4Ser)3 |
| 61 | リンカー | (Gly4Ser)4 |
| 62 | NY-ESO-1 ネオエピトープ(SLL) | SLLMWITQC |
| 63 | インフルエンザウイルス M1 タンパク質ネオエピトープ(GIL) | GILGFVFTL |
| 64 | フォワードプライマー | GTCAGTAATTGCGGTTCTCACC |
| 65 | リバースプライマー | GTACAGTGGGAACAAAGTCG |
| 66 | フォワードプライマー | CCGGGGTAGAACCTAAAAGTTCCG |

10

20

30

40

【 0 4 3 9 】

50

【表 4 - 1 0】

| | | | |
|----|-----------------------|---------------------------|----|
| 67 | リバースプライマー | TTTGTCTGCACGCGTGGATC | |
| 68 | フォワードプライマー | GGGTAATTAATCAGCGAAGCGATG | |
| 69 | フォワードプライマー | GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT | |
| 70 | リバースプライマー | AGGCACAATCAGCATTGGTAGCTG | |
| 71 | NPM1c ネオエピトープ | AIQDLCAVAV | 10 |
| 72 | NPM1c ネオエピトープ | CLAVEEVSL | |
| 73 | NPM1c ネオエピトープ | VEEVSLRK | |
| 74 | NPM1c ネオエピトープ | AVEEVSLR | |
| 75 | NPM1c ネオエピトープ | AVEEVSLRK | |
| 76 | NPM1c ネオエピトープ | CLAVEEVSLRK | 20 |
| 77 | AIQ X ₁ 置換 | VIQDLCLAV | |
| 78 | AIQ X ₁ 置換 | LIQDLCLAV | |
| 79 | AIQ X ₁ 置換 | IIQDLCLAV | |
| 80 | AIQ X ₃ 置換 | AINDLCLAV | |
| 81 | AIQ X ₄ 置換 | AIQELCLAV | |
| 82 | AIQ X ₅ 置換 | AIQDICLAV | |
| 83 | AIQ X ₅ 置換 | AIQDVCLAV | |
| 84 | AIQ X ₅ 置換 | AIQDMCLAV | |
| 85 | AIQ X ₅ 置換 | AIQDACLAV | |
| 86 | AIQ X ₅ 置換 | AIQDFCLAV | 30 |
| 87 | AIQ X ₆ 置換 | AIQDLSLAV | |
| 88 | AIQ X ₆ 置換 | AIQDLALAV | |
| 89 | AIQ X ₇ 置換 | AIQDLCLAV | |
| 90 | AIQ X ₇ 置換 | AIQDLCAVAV | |
| 91 | AIQ X ₇ 置換 | AIQDLCMAV | |
| 92 | AIQ X ₇ 置換 | AIQDLCAAV | |
| 93 | AIQ X ₇ 置換 | AIQDLCAVAV | |
| 94 | AIQ X ₈ 置換 | AIQDLCLVV | |
| 95 | AIQ X ₈ 置換 | AIQDLCLLV | |
| 96 | AIQ X ₈ 置換 | AIQDLCLIV | 40 |

【 0 4 4 0】

参照による組み込み

本明細書で引用した特許、特許出願、および刊行物等のすべての参考文献の開示は、全体としてこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

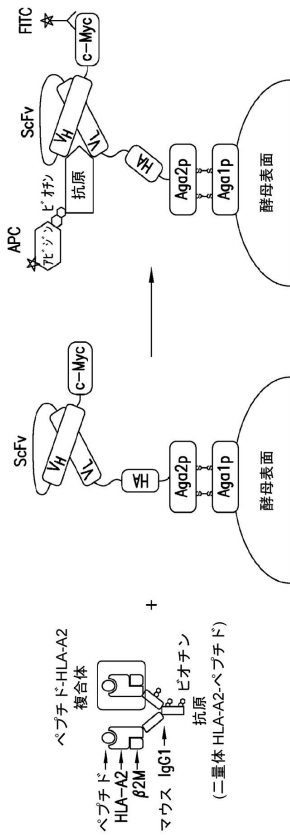


図 1A

【 図 1 - 2 】

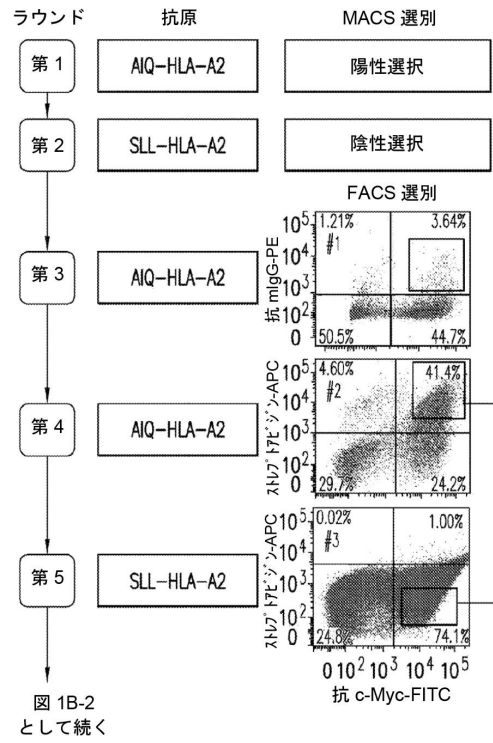
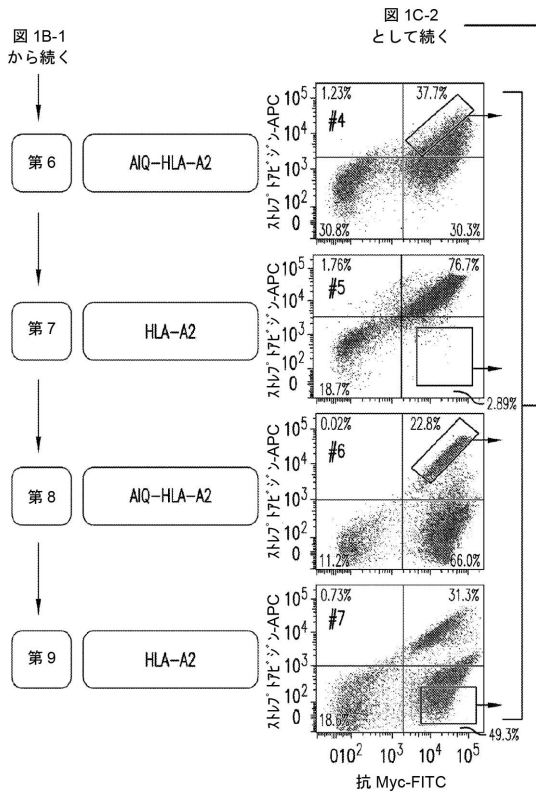


図 1B-1

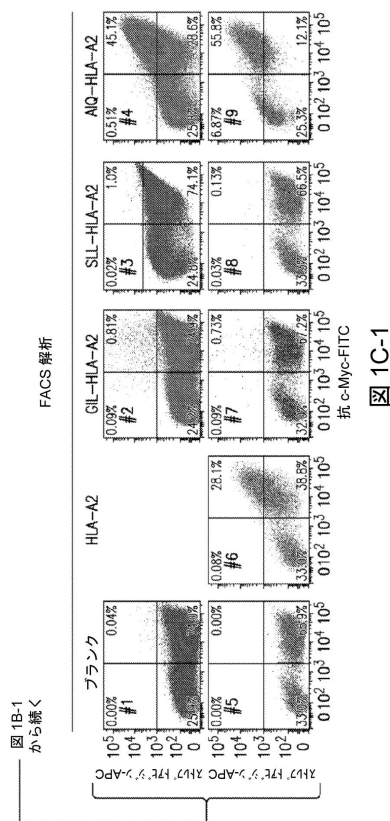
10

20

【 図 1 - 3 】



【 図 1 - 4 】

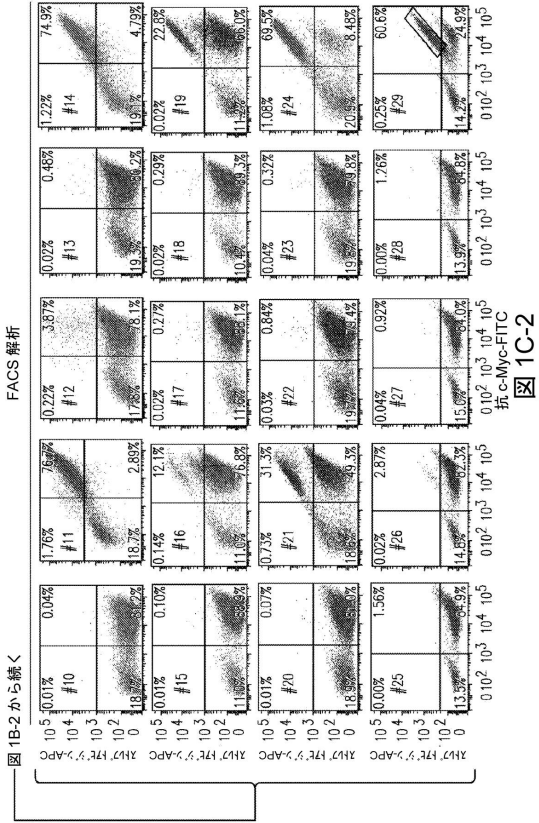


30

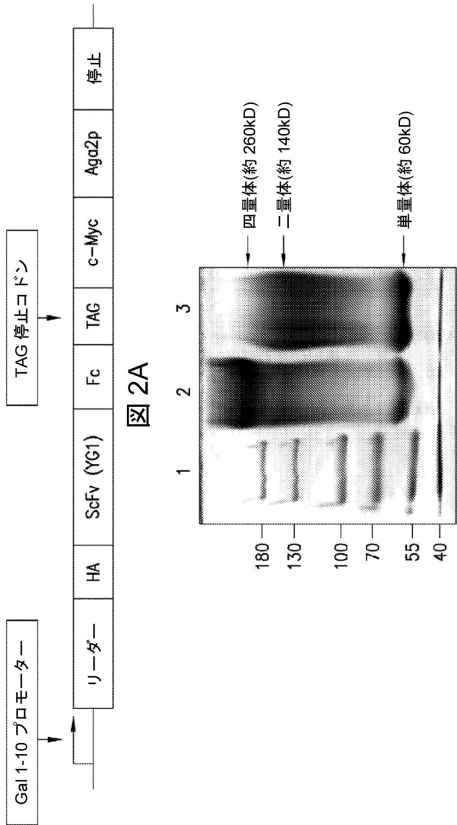
40

50

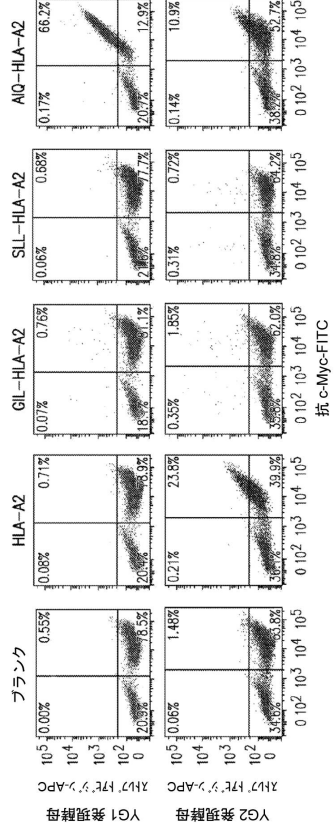
【 図 1 - 5 】



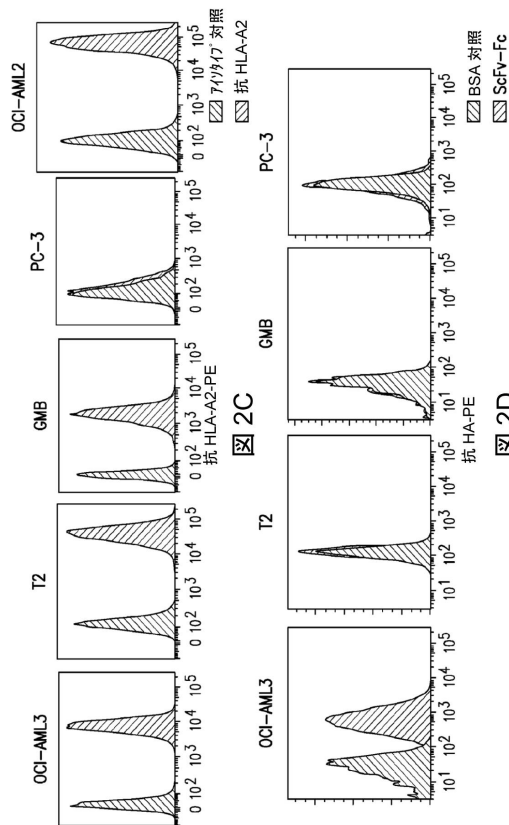
【 図 2 - 1 】



【 図 1 - 6 】



【 図 2 - 2 】



10

20

30

40

50

【 図 2 - 3 】

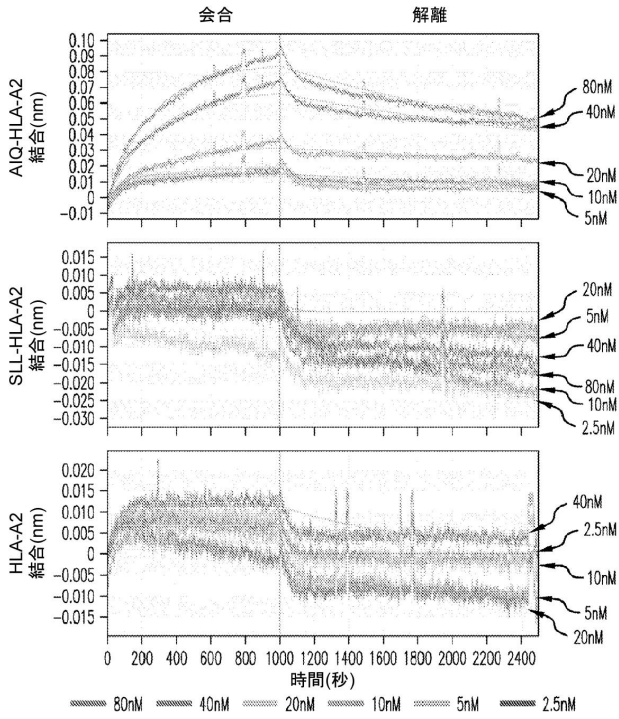


図 2E

【 図 3 - 1 】

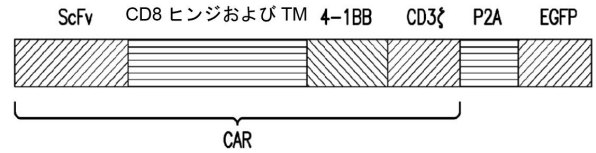


図 3A

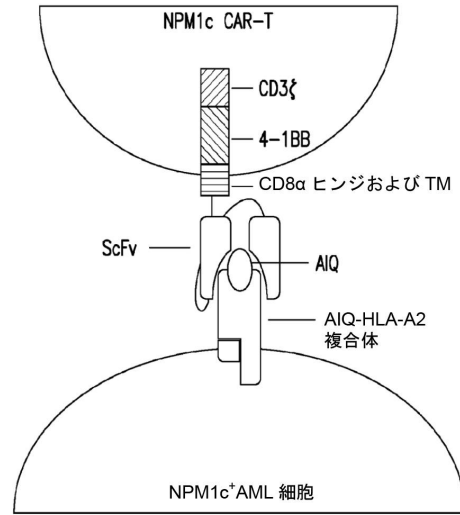


図 3B

10

20

【 図 3 - 2 】

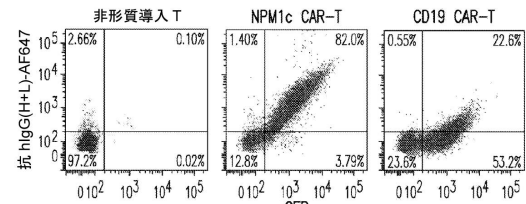


図 3C

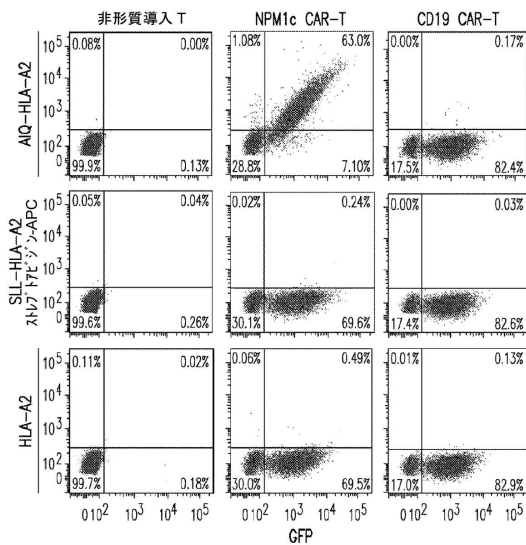


図 3D

【 図 4 - 1 】

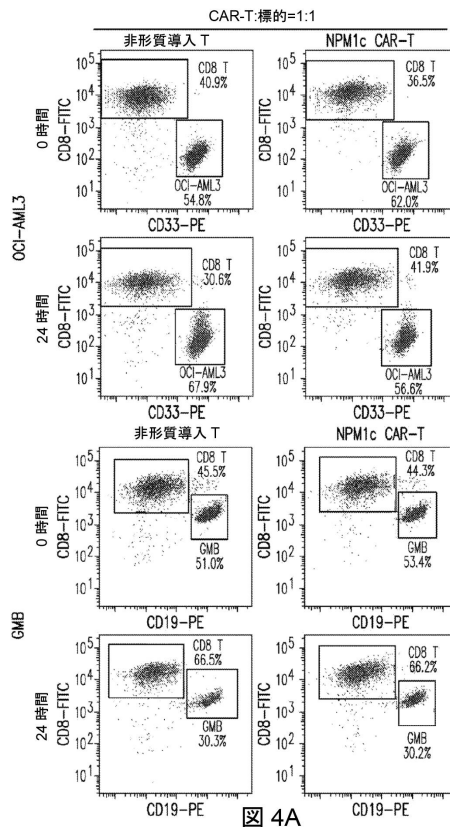


図 4A

30

40

50

【 図 4 - 2 】

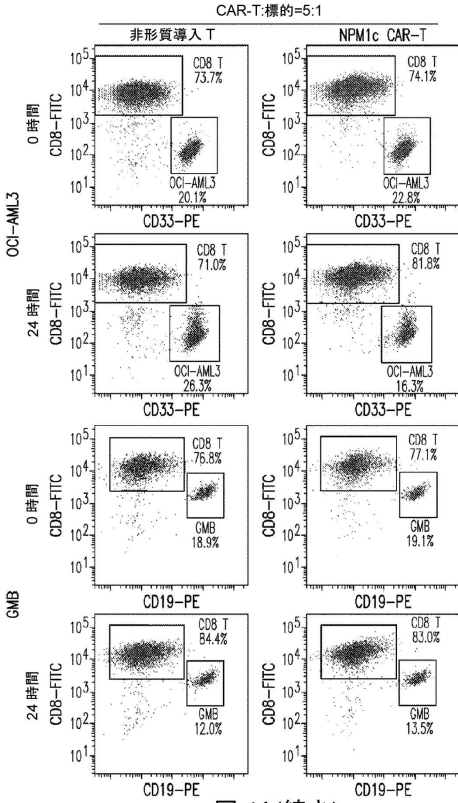


図 4A(続き)

【 図 4 - 3 】

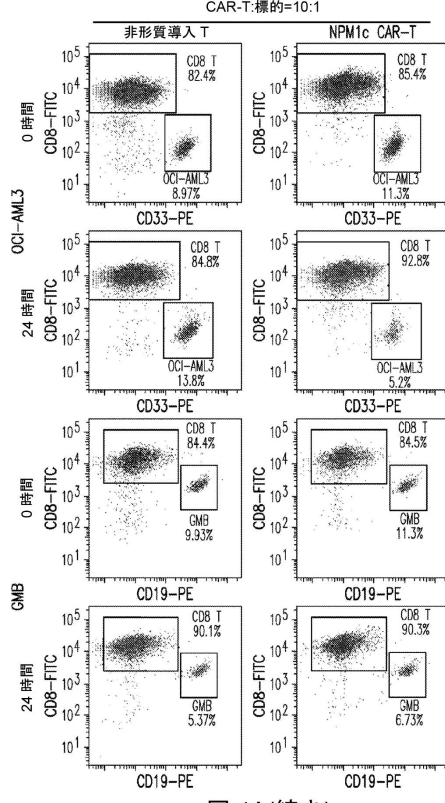


図 4A(続き)

10

20

【 図 4 - 4 】

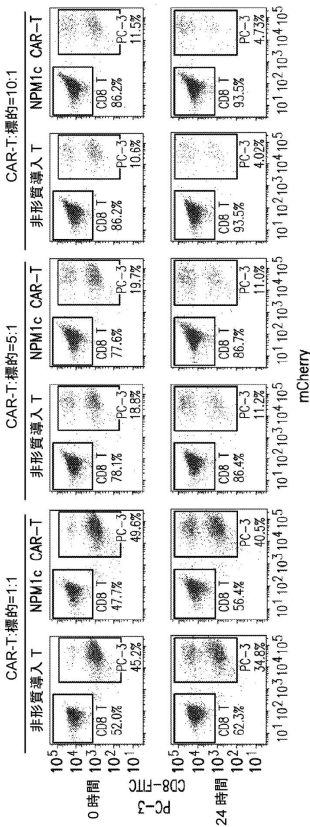


図 4A(続き)

【 図 4 - 5 】

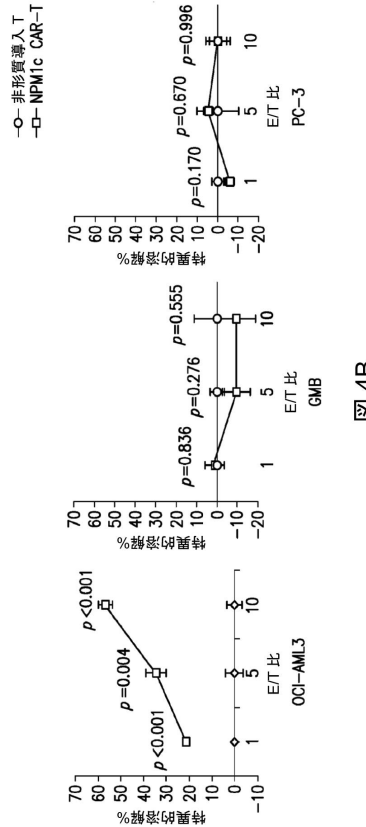


図 4B

30

40

50

【 図 4 - 6 】

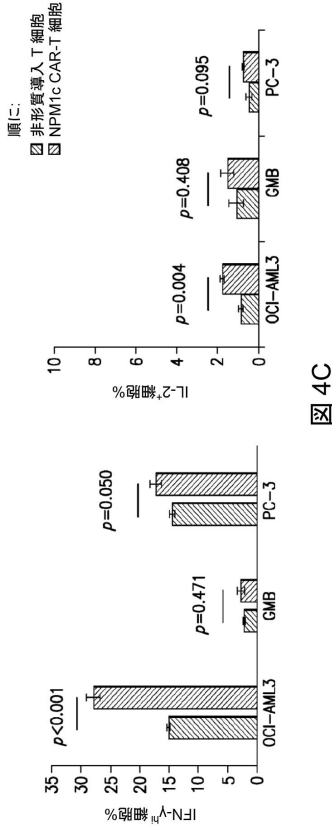


図 4C

【 図 4 - 8 】

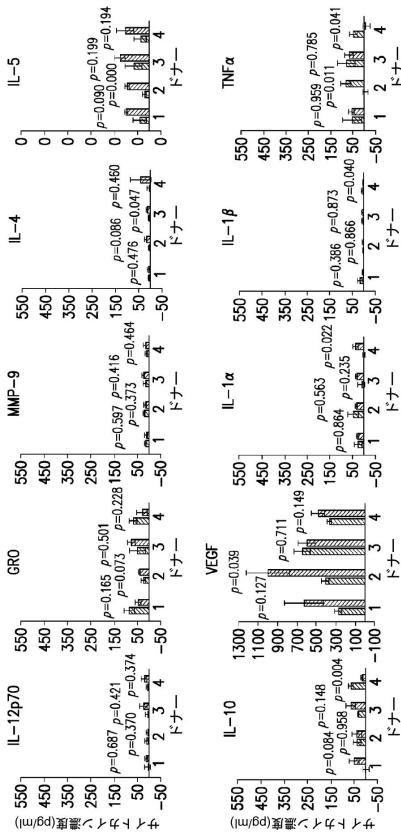


図 4D(続き)

非形質導入 T 細胞
NPM1c CAR-T 細胞

【 図 4 - 7 】

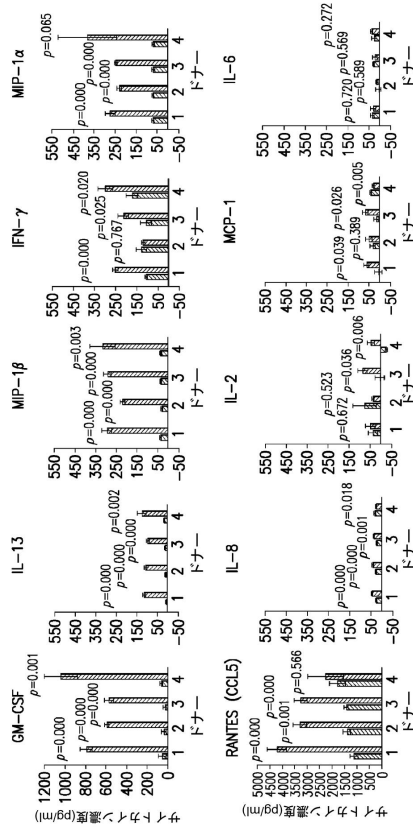


図 4D

非形質導入 T 細胞
NPM1c CAR-T 細胞

【 図 4 - 9 】

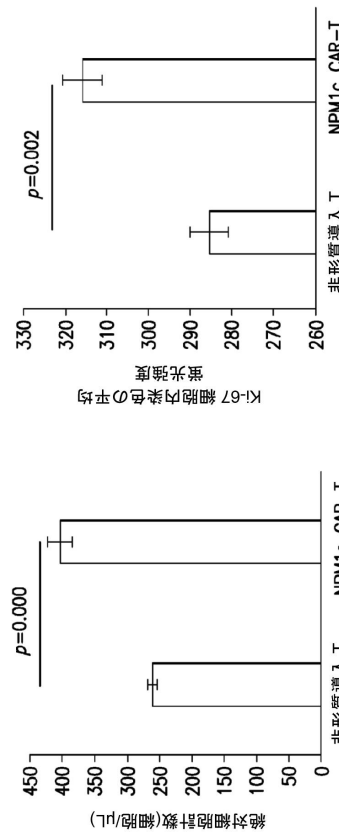


図 4F

図 4E

【 図 4 - 1 0 】

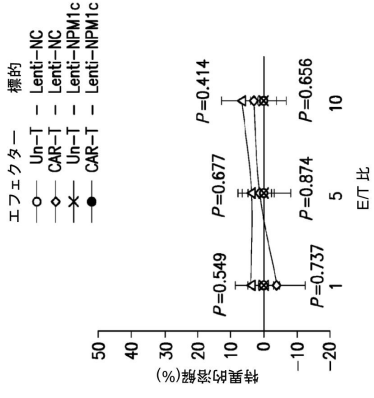


図 4H

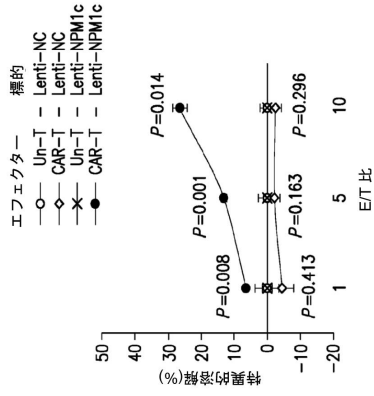


図 4G

【 図 4 - 1 2 】

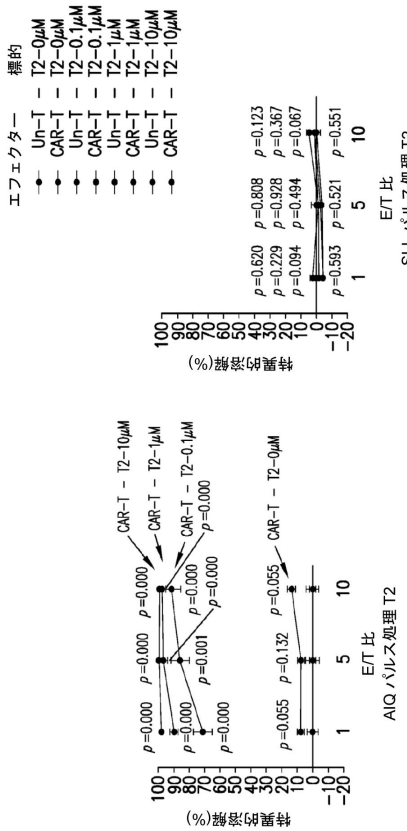


図 4J

【 図 4 - 1 1 】

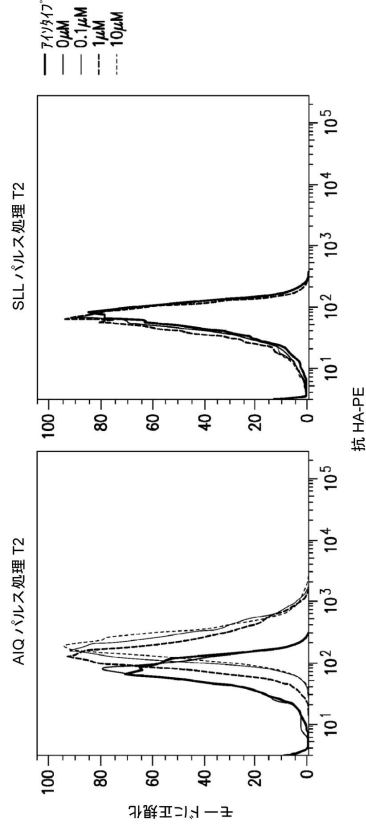


図 4I

【 図 5 - 1 】

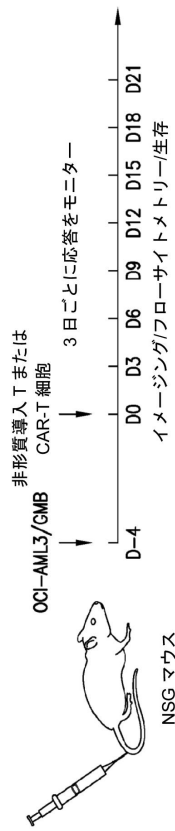


図 5A

10

20

30

40

50

【 図 5 - 2 】

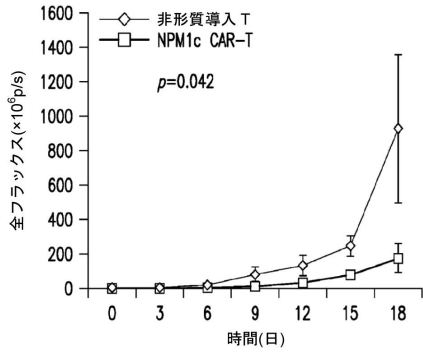


図 5B

【 図 5 - 3 】

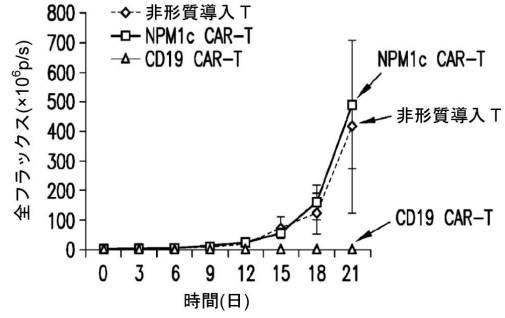


図 5D

10

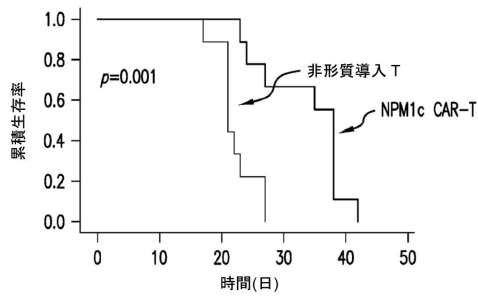


図 5C

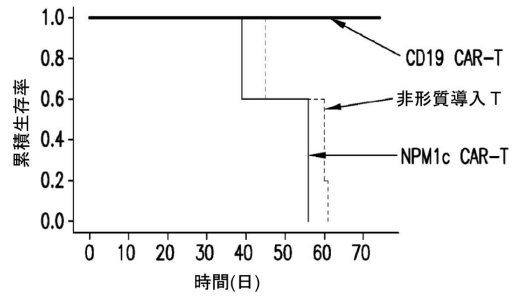


図 5E

20

【 図 5 - 4 】

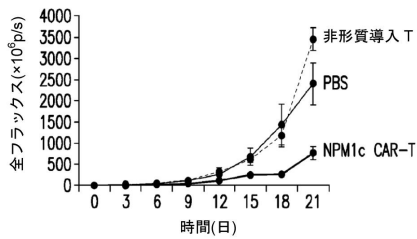


図 5F

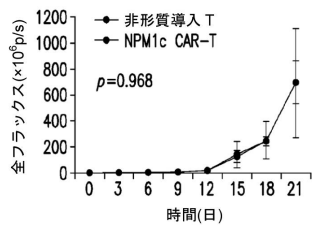


図 5G

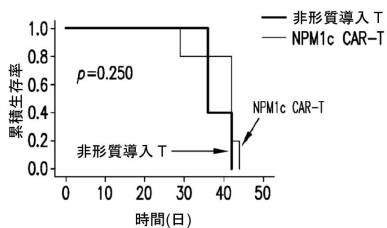


図 5H

【 図 6 - 1 】

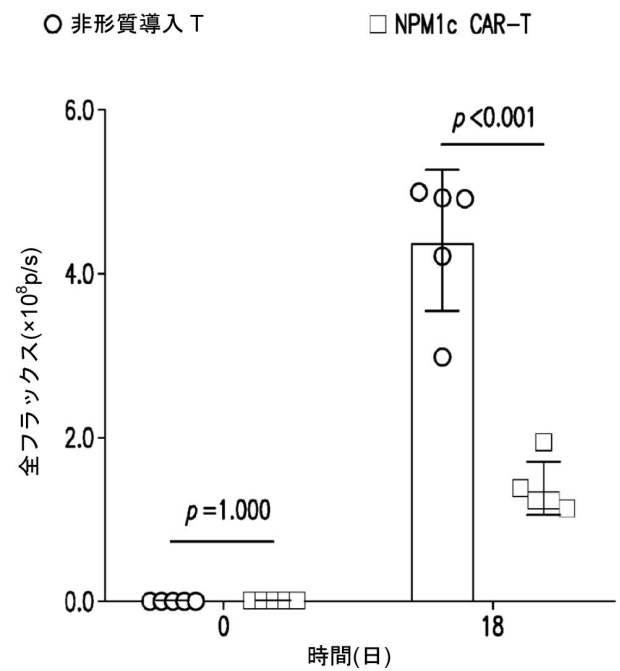


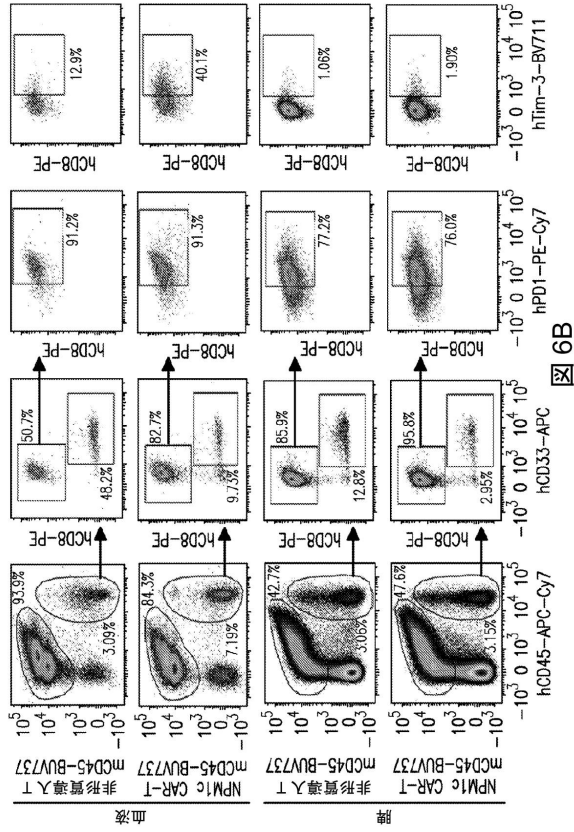
図 6A

30

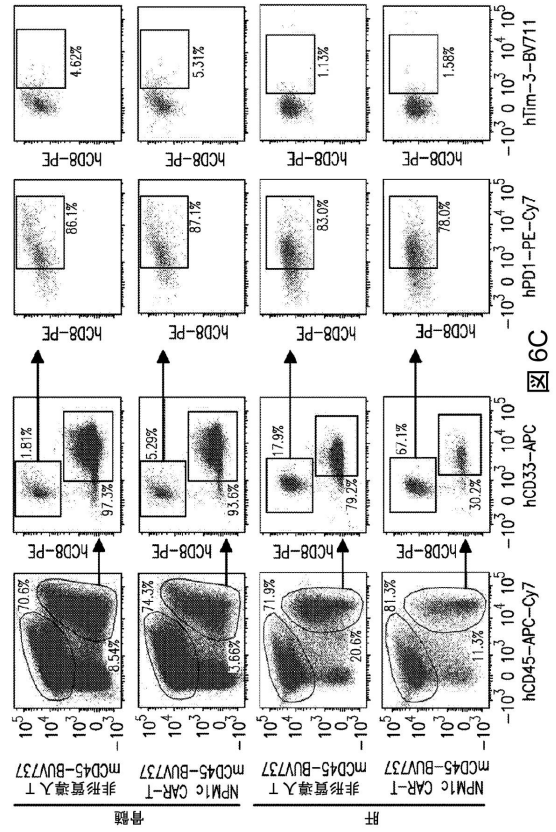
40

50

【 図 6 - 2 】



【 図 6 - 3 】



10

20

【 図 6 - 4 】

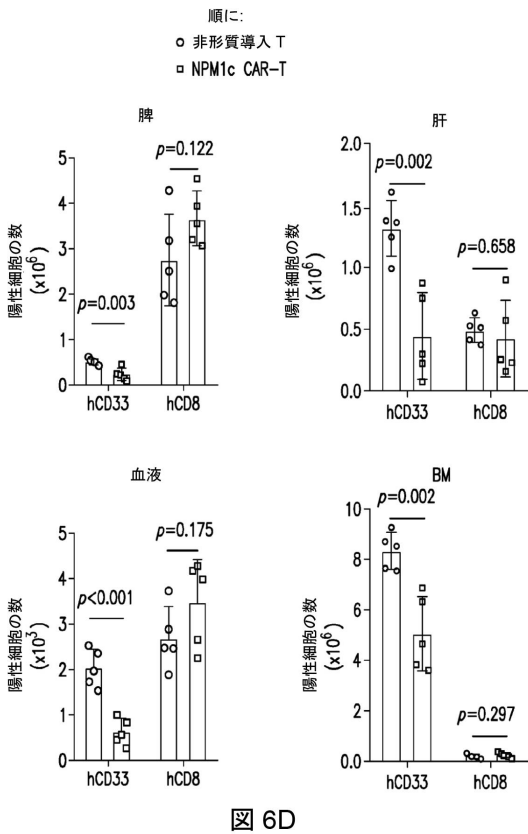


図 6D

【 図 6 - 5 】

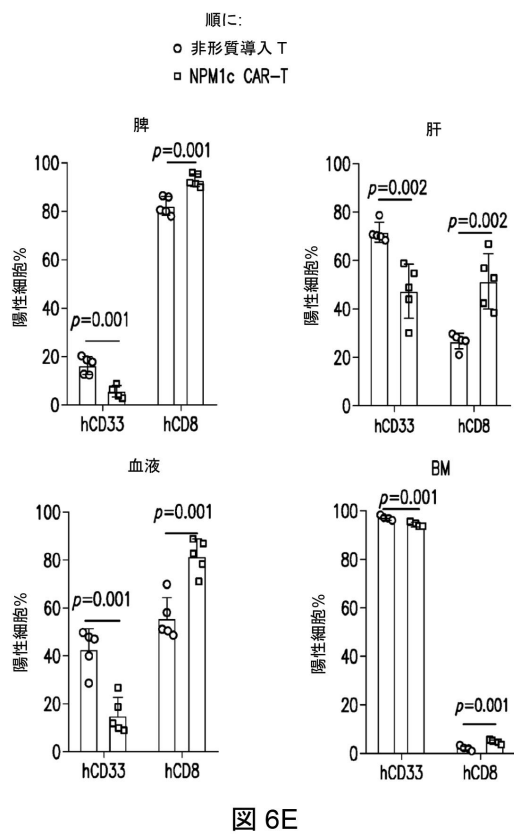


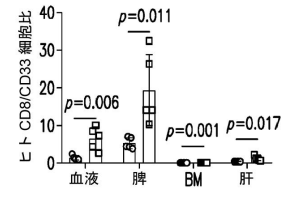
図 6E

30

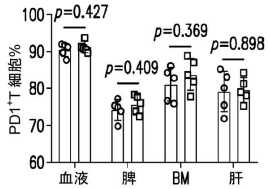
40

50

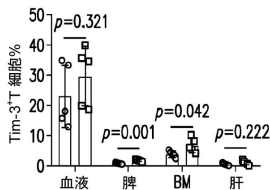
【 図 6 - 6 】



順に: ○ 非形質導入 T □ NPM1c CAR-T
図 6F



順に: ○ 非形質導入 T □ NPM1c CAR-T
図 6G



順に: ○ 非形質導入 T □ NPM1c CAR-T
図 6H

【 図 6 - 8 】

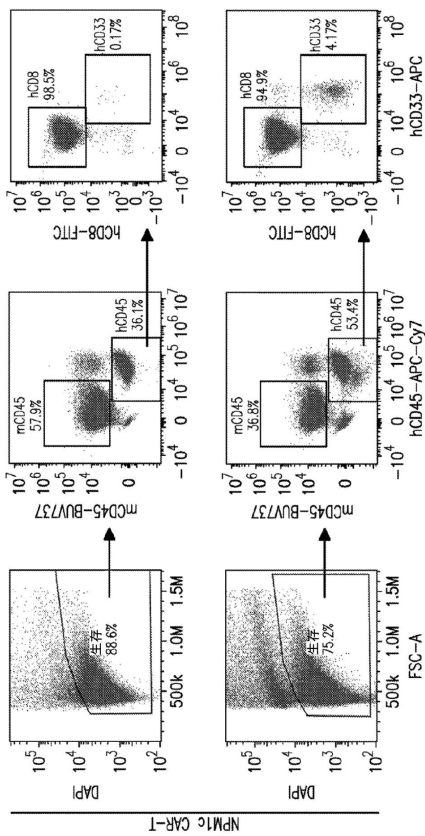
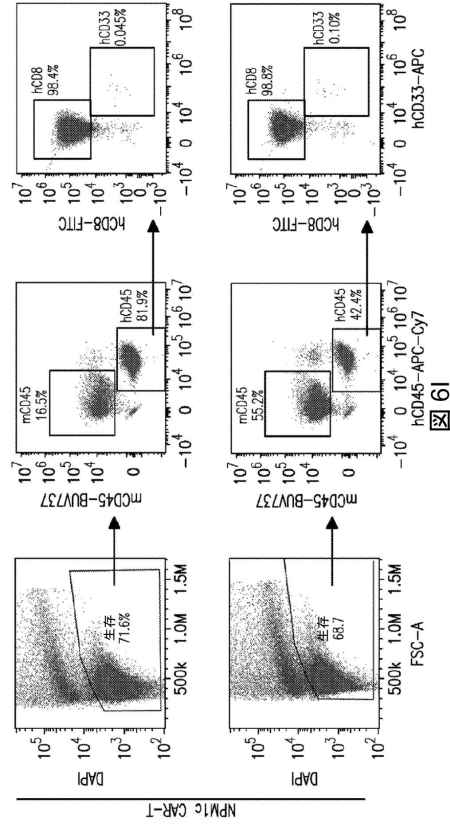


図 6(続き)

【 図 6 - 7 】



【 図 6 - 9 】

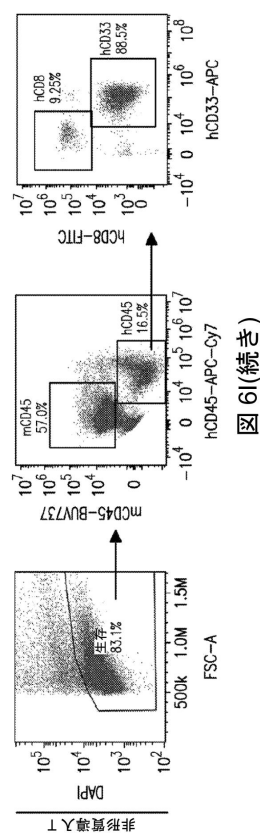


図 6(続き)

10

20

30

40

50

【 図 6 - 10 】

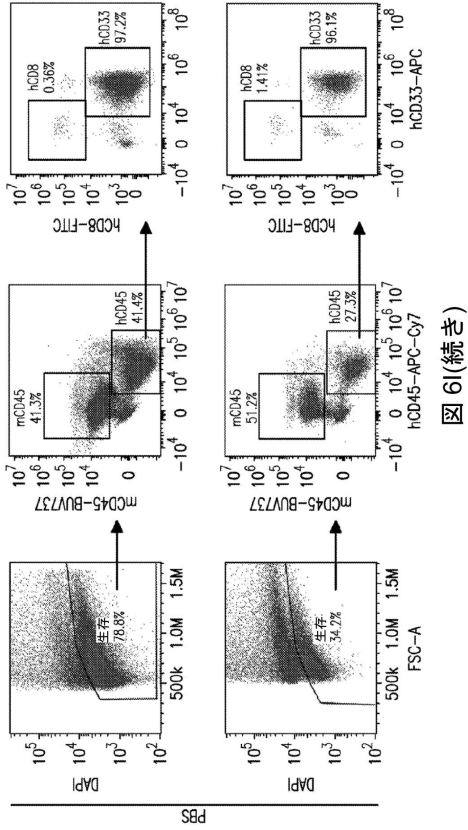


図 6(続き)

【 図 7 - 1 】

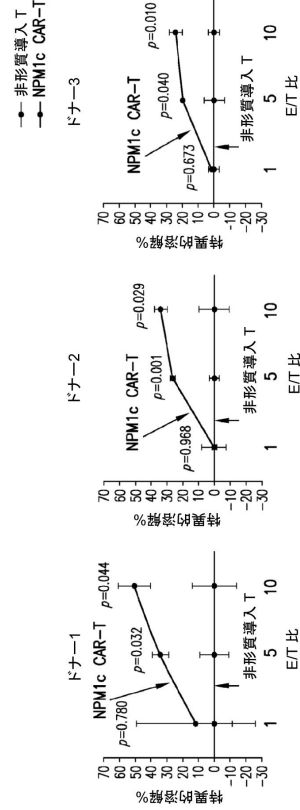


図 7A

10

20

【 図 7 - 2 】

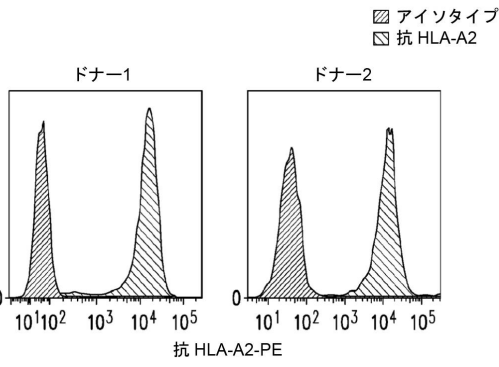


図 7B

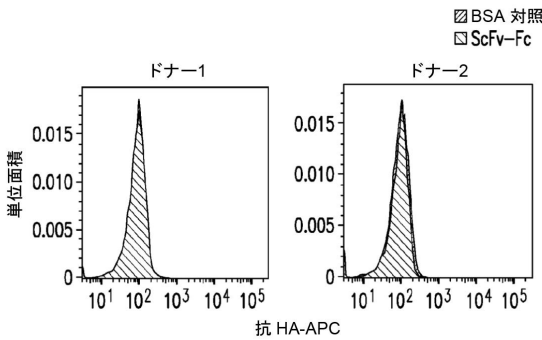


図 7C

【 図 7 - 3 】

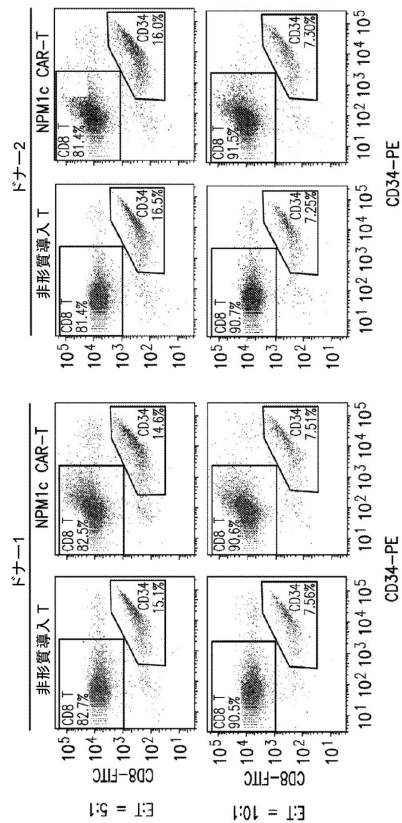


図 7D

30

40

50

【 図 7 - 4 】

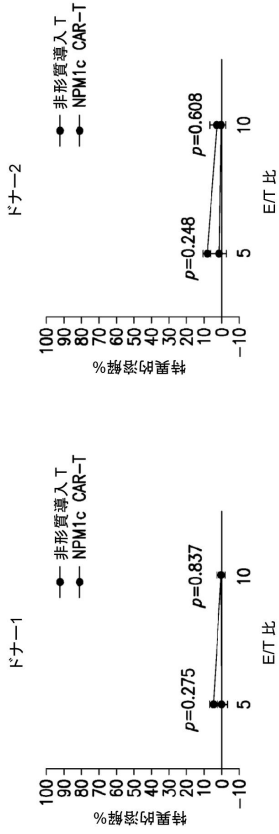


図 7E

【 図 7 - 5 】

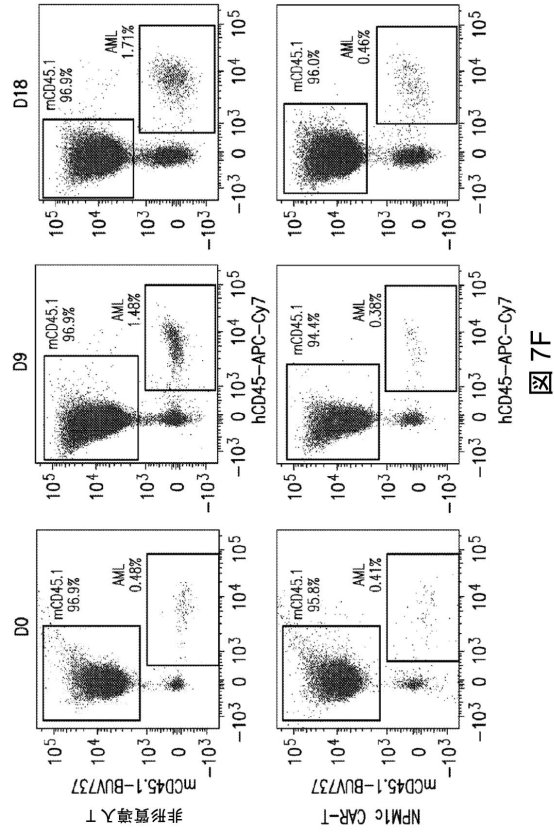


図 7F

【 図 7 - 6 】

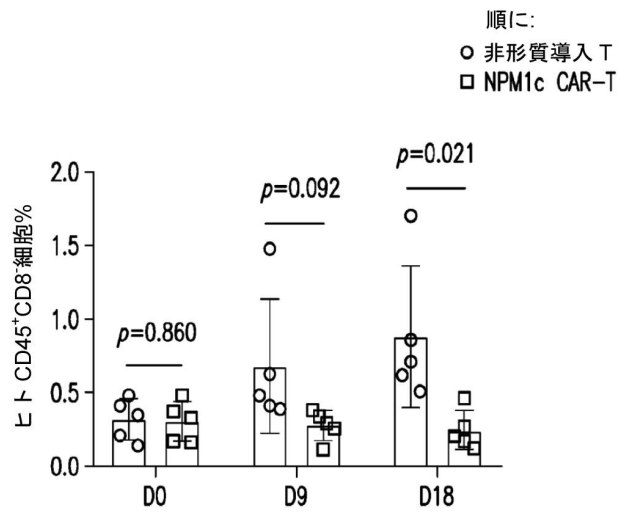


図 7G

【 配列表 】

2023517889000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/012701

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 C07K16/30 A61K39/00 C07K14/725 ADD. | | |
|--|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K | | |
| 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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X A | WO 2019/004831 A1 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H O D N LEIDS UNIV MEDISCH CENTRUM [NL]) 3 January 2019 (2019-01-03) the whole document ----- -/-- | 1-26, 28-65, 67-96 27 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 13 July 2021 | | Date of mailing of the international search report 09/08/2021 |
| 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 Covone-van Hees, M |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2021/012701 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | VAN DER LEE DYANTHA I. ET AL: "Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION , vol. 129, no. 2 1 February 2019 (2019-02-01), pages 774-785, XP055815085, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI97482 Retrieved from the Internet: URL:https://www.jci.org/articles/view/9748 2/version/2/pdf/render.pdf | 1-26, 28-65, 67-96 |
| A | the whole document | 27 |
| X | WO 2012/044999 A2 (LUDWIG INST FOR CANCER RES LTD [US]; LUESCHER IMMANUEL F [CH] ET AL.) 5 April 2012 (2012-04-05) 100% identity with seq.1 and 71; sequences 90,91 | 1-11 |
| A | COHEN C J ET AL: "RECOMBINANT ANTIBODIES WITH MHC-RESTRICTED, PEPTIDE-SPECIFIC, T-CELL RECEPTOR-LIKE SPECIFICITY: NEW TOOLS TO STUDY ANTIGEN PRESENTATION AND TCR-PEPTIDE-MHC INTERACTIONS", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, HEYDEN & SON LTD., LONDON, GB, vol. 16, no. 5, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 324-332, XP008050078, ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/JMR.640 the whole document | 1-96 |
| X,P | XIE GUOZHU ET AL: "CAR-T cells targeting a nucleophosmin neopeptide exhibit potent specific activity in mouse models of acute myeloid leukaemia", NATURE BIOMEDICAL ENGINEERING, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 5, no. 5, 12 October 2020 (2020-10-12), pages 399-413, XP037453961, DOI: 10.1038/S41551-020-00625-5 the whole document | 1-26, 28-65, 67-96 |
| A,P | the whole document | 27 |
| X,P | WO 2020/081537 A1 (UNIV TEXAS TECH SYSTEM [US]) 23 April 2020 (2020-04-23) 100% identity with seq.1 and 71; sequences 138,139 | 1-11 |
| | -/-- | |

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2021/012701 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X,P | DONG H ET AL: "Engineered Memory-like NK Cells Targeting a Neoepitope Derived from Intracellular NPM1c Exhibit Potent Activity and Specificity Against Acute Myeloid Leukemia", BLOOD, & 62ND AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY ANNUAL MEETING; 5-8 DECEMBER 2020, vol. 136, no. Suppl. 1, 5 November 2020 (2020-11-05), XP055815141, the whole document | 1-96 |
| A | ----- HE QINGHUA ET AL: "TCR-like antibodies in cancer immunotherapy", JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY , vol. 12, no. 1 14 September 2019 (2019-09-14), pages 99-99, XP055822672, London UK ISSN: 1756-8722, DOI: 10.1186/s13045-019-0788-4 Retrieved from the Internet: URL:https://jhoonline.biomedcentral.com/tr ack/pdf/10.1186/s13045-019-0788-4.pdf the whole document | 1-96 |
| A | ----- J. GREINER ET AL: "Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4+ and CD8+ T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia", BLOOD, vol. 120, no. 6, 9 August 2012 (2012-08-09), pages 1282-1289, XP055426172, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-11-394395 cited in the application the whole document | 1-96 |
| | ----- | |

10

20

30

40

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/012701

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/012701

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2019004831 A1 | 03-01-2019 | CA 3067772 A1 | 03-01-2019 |
| | | CN 111032686 A | 17-04-2020 |
| | | EP 3645560 A1 | 06-05-2020 |
| | | JP 2020530274 A | 22-10-2020 |
| | | KR 20200023311 A | 04-03-2020 |
| | | US 2020123200 A1 | 23-04-2020 |
| | | WO 2019004831 A1 | 03-01-2019 |
| ----- | | | |
| WO 2012044999 A2 | 05-04-2012 | US 2013289253 A1 | 31-10-2013 |
| | | US 2018346606 A1 | 06-12-2018 |
| | | WO 2012044999 A2 | 05-04-2012 |
| ----- | | | |
| WO 2020081537 A1 | 23-04-2020 | NONE | |
| ----- | | | |

10

20

30

40

50

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 | Z |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 19/00 | |
| C 0 7 K 14/725 (2006.01) | C 0 7 K 14/725 | |
| C 0 7 K 14/705 (2006.01) | C 0 7 K 14/705 | |
| C 0 7 K 14/52 (2006.01) | C 0 7 K 14/52 | |
| C 0 7 K 14/54 (2006.01) | C 0 7 K 14/54 | |
| C 0 7 K 14/525 (2006.01) | C 0 7 K 14/525 | |
| C 0 7 K 14/57 (2006.01) | C 0 7 K 14/57 | |
| C 1 2 N 15/867 (2006.01) | C 1 2 N 15/867 | Z |
| C 1 2 N 5/0783 (2010.01) | C 1 2 N 5/0783 | |
| C 1 2 N 5/0786 (2010.01) | C 1 2 N 5/0786 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | U |
| | A 6 1 K 35/17 | |
| | C 1 2 N 15/12 | |

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

ード 3 1

(72)発明者 シェ , グゥオツ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , アパートメント 8 - 7 シー ,
メモリアル ドライブ 1 0 0

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AB01 AC14 BA01 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 BB01 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43
CC23 GG01 GG02
4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 MA55 MA66 NA05 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA02 DA14 DA18
DA50 DA76 EA28