

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0167276

(43) 공개일자 2022년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/30 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/3061 (2013.01)

A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7034243

(22) 출원일자(국제) 2021년01월08일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년09월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/012701

(87) 국제공개번호 WO 2021/183207

국제공개일자 2021년09월16일

(30) 우선권주장

62/987,612 2020년03월10일 미국(US)

(71) 출원인

매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지

미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애
비뉴 77

(72) 발명자

첸, 지안주

미국 매사추세츠 02420 렉싱턴 와이먼 로드 31

시에, 귀주

미국 매사추세츠 02142 케임브리지 메모리얼 드라
이브 100 에이피티. 8-7씨

(74) 대리인

특허법인 광장리앤코

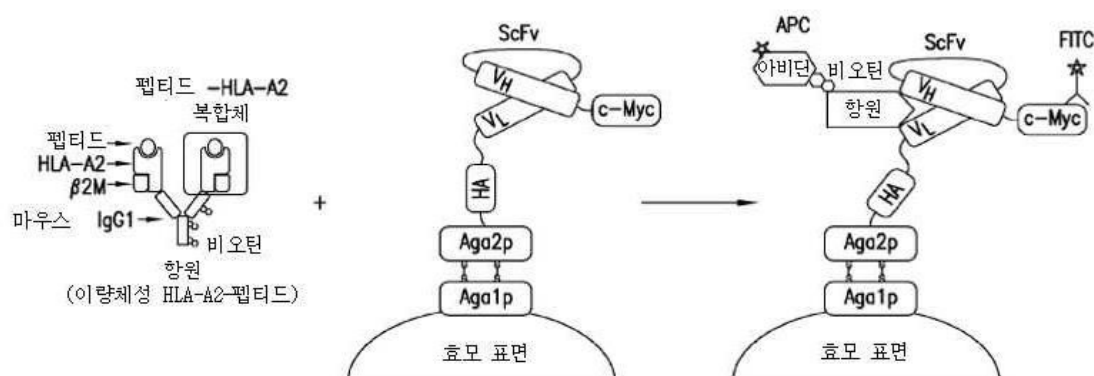
전체 청구항 수 : 총 96 항

(54) 발명의 명칭 NPM1c-양성 암의 면역치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루거나 이에 의해 제시되는 돌연변이체 뉴클레오포스민(NPM1c)의 네오에피토프에 결합하는 화합물(예를 들어, 항체, 이의 항원-결합 단편, 이중특이적 분자 또는 키메라 항원 수용체 폴리펩티드), 또는 상기 화합물을 발현하는 세포, 및 암을 치료하거나, 암의 하나 이상의 증상을 개선하기 위한 방법에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2021.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/283 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이

(a) MHC 클래스 I 단백질 단독, 및/또는

(b) MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드

에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않고,

선택적으로 대조군 펩티드가 NY-ESO-1 에피토프 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프인,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

NPM1c 네오에피토프가 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ 를 포함하고,

X_1 이 A, V, L 또는 I로부터 선택되고,

X_2 가 A, T, S, V, L, I, M 또는 Q로부터 선택되고,

X_3 이 Q 또는 N으로부터 선택되고,

X_4 가 D 또는 E로부터 선택되고,

X_5 가 L, I, V, M, A 또는 F로부터 선택되고,

X_6 이 C, S 또는 A로부터 선택되고,

X_7 이 L, I, V, M, A 또는 F로부터 선택되고,

X_8 이 A, V, L 또는 I로부터 선택되고,

X_9 가 L, I, V, M 또는 A로부터 선택되는,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서,

X_1 이 A 또는 V로부터 선택되고,

X_2 가 V, I 또는 L로부터 선택되고,

X_3 이 Q 또는 N으로부터 선택되고,

X_4 가 D 또는 E로부터 선택되고,
 X_5 가 L 또는 I로부터 선택되고,
 X_6 이 C 또는 S로부터 선택되고,
 X_7 이 V, L 또는 I로부터 선택되고,
 X_8 이 A 또는 V로부터 선택되고,
 X_9 가 V, I 또는 L로부터 선택되는,
 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서,
 X_1 이 A이고,
 X_2 가 V, I 또는 L로부터 선택되고,
 X_3 이 Q이고,
 X_4 가 D이고,
 X_5 가 L이고,
 X_6 이 C이고,
 X_7 이 L이고,
 X_8 이 A이고,
 X_9 가 V, I 또는 L로부터 선택되는,
 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,
 NPM1c 네오에피토프가 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 또는 AIQDLCVAV(서열번호: 71)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,
 NPM1c 네오에피토프가 CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75), CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
 네오에피토프가 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

네오에피토프가 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기 길이인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

MHC 클래스 I 단백질이 HLA-A*02 단백질이거나, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

MHC 클래스 I 단백질이 HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하되, 여기서 상기 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3이 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 VH의 CDR인, 중쇄 가변 영역(VH), 및/또는

(ii) VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하되, 여기서 상기 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3이 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 VL의 CDR인, 경쇄 가변 영역(VL)

을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 여기서 VH CDR1이 아미노산 서열 GFTFSSYA(서열번호: 9)를 갖고, VH CDR2가 아미노산 서열 ISGSGGST(서열번호: 10)를 갖고, VH CDR3이 아미노산 서열 ARLGYPTTLLPFDY(서열번호: 11)를 갖는,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제13항에 있어서,

VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 추가로 포함하고, 여기서 VL CDR1이 아미노산 서열 QSISSY(서열번호: 6)를 갖고, VL CDR2가 아미노산 서열 AAS(서열번호: 7)를 갖고, VL CDR3이 아미노산 서열 QQSYSTPLT(서열번호: 8)를 갖는,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH가 서열번호: 5의 아미노산 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나, VL이 서열번호: 3의 아미노산 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH가 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, VL이 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,
인간, 인간화 또는 키메라 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서
단일쇄 Fv(scFv), Fv 단편, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편 또는 단일쇄 항체 분자인, 항체 또는 이의 항원
결합 단편.

청구항 19

제18항에 있어서,
scFv인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제19항에 있어서,
scFv가 인간 scFv인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서,
scFv가 링커를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서,
링커가 펩티드 링커인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 23

제22항에 있어서,
펩티드 링커가 Gly-Ser 링커인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 24

제23항에 있어서,
Gly-Ser 링커가 (Gly4Ser)(서열번호: 58), (Gly4Ser)₂(서열번호: 59), (Gly4Ser)₃(서열번호: 60) 및
(Gly4Ser)₄(서열번호: 61)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 25

제23항에 있어서,
Gly-Ser 링커가 아미노산 서열 SGSSGGSSSG(서열번호: 4)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,
scFv가 서열번호: 2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산
서열을 갖고;

선택적으로, scFv가

(a) VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하되, 여기서 VH CDR1이 아미노산 서열 GFTFSSYA
(서열번호: 9)를 갖고, VH CDR2가 아미노산 서열 ISGSGGST(서열번호: 10)를 갖고, VH CDR3이 아미노산 서열

ARLGYPPTTLLPFDY(서열번호: 11)를 갖는, 중쇄 가변 영역(VH); 및/또는

(b) VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하되, 여기서 VL CDR1이 아미노산 서열 QSISSY(서열번호: 6)를 갖고, VL CDR2가 아미노산 서열 AAS(서열번호: 7)를 갖고, VL CDR3이 아미노산 서열 QQSYSTPLT(서열번호: 8)를 갖는, 경쇄 가변 영역(VL)

을 포함하는,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 27

제19항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

scFv가 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 28

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 29

제28항에 있어서,

항체가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE 항체 동종형(isotype)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 30

제29항에 있어서,

항체가 IgG1 동종형 또는 IgG4 동종형의 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 31

제30항에 있어서,

항체가 야생형 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 야생형 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 32

제30항에 있어서,

항체가 돌연변이체 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 33

제32항에 있어서,

항체가 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함하고,

돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역이 EU 번호지정(EU numbering)에 따라, 다음의 치환: S228P, L235E, L235A 또는 이들의 조합 중 어느 하나를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 34

제28항 내지 제30항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,
항원이 암 세포의 표면에 있는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 36

제35항에 있어서,
암이 급성 골수성 백혈병(AML)인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,
100 nM 이하, 50 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 0.5 nM 내지 100 nM, 또는 1 nM 내지 15 nM의 평형 해리 상수(Kd)로, 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,
면역 이펙터 세포 상의 제2 항원에 추가로 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 39

제38항에 있어서,
이펙터 세포가 T 세포, 자연 살해 세포 또는 대식세포인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서,
제2 항원이 CD3인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 41

제40항에 있어서,
CD3이 T 세포에서 발현된 인간 CD3인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 42

제38항 또는 제39항에 있어서,
제2 항원이 NKp46인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 43

제42항에 있어서,
NKp46이 NK 세포에서 발현된 인간 NKp46인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 44

제38항 또는 제39항에 있어서,
제2 항원이 CD16A인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 45

제44항에 있어서,

CD16A가 NK 세포에서 발현된 인간 CD16A인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 46

제38항 또는 제39항에 있어서,

제2 항원이 CD40, CD47, 4-1BB, TGF- β , LAG-3, PD-1, TIM-3, CTLA-4, OX40, NKp30, NKG2A, NKG2D 또는 DNAM-1인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

정제된 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 48

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 49

제48항에 있어서,

서열번호: 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 50

제48항 또는 제49항의 핵산을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 51

제50항의 발현 벡터로 형질전환된, 세포.

청구항 52

항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 제51항의 세포를 유지하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기 위한 방법.

청구항 53

제52항에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편을 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 55

세포내 도메인,

막횡단 도메인, 및

클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인

을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 56

세포내 도메인,

막횡단 도메인, 및

제1항 내지 제27항 및 제38항 내지 제46항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 결합 도메인

을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서,

막횡단 도메인이 CD3-제타, CD8, CD28, NKG2D, CD16, NKp44 또는 NKp46의 막횡단 도메인을 포함하는, CAR 폴리펩티드.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

세포내 도메인이, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 2B4, DAP10, CD137 및 DAP12로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공동자극 분자의 공동자극 도메인을 하나 이상 포함하는, CAR 폴리펩티드.

청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

세포내 도메인이 CD3-제타 신호전달 도메인 및 4-1BB 공동자극 도메인을 포함하고;

막횡단 도메인이 CD8 막횡단 도메인을 포함하고;

CAR 폴리펩티드가 CD8 힌지 영역을 추가로 포함하는,

CAR 폴리펩티드.

청구항 60

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서,

세포내 도메인이 서열번호: 27에 따른 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 신호전달 도메인, 및 서열번호: 26에 따른 아미노산 서열을 포함하는 4-1BB 공동자극 도메인을 포함하고;

CAR 폴리펩티드가 CD8 막횡단 도메인 및 CD8 힌지 영역을 포함하고;

CD8 막횡단 도메인 및 CD8 힌지 영역이 서열번호: 25에 따른 아미노산 서열을 포함하고;

세포외 결합 도메인이 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 서열번호: 23에 따른 아미노산 서열을 포함하는 선도 서열(leading sequence)을 포함하는,

CAR 폴리펩티드.

청구항 61

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서,

세포외 결합 도메인 내의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, 서열번호: 24에 따른 아미노산 서열, 또는 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일 한 아미노산 서열을 포함하는 scFv인, CAR 폴리펩티드.

청구항 62

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

세포내 도메인이 자가-절단 펩티드 서열 및 사이토카인을 추가로 포함하고, 자가-절단 펩티드의 절단이 사이토 카인을 방출하는, CAR 폴리펩티드.

청구항 63

제62항에 있어서,

사이토카인이 IL-12, IL-7, IL-13, IL-15, TNF- α , IFN- γ 또는 CCL19인, CAR 폴리펩티드.

청구항 64

제55항 또는 제56항에 있어서,

서열번호: 22에 따른 아미노산 서열, 또는 서열번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, CAR 폴리펩티드.

청구항 65

제55항 내지 제64항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 66

제65항에 있어서,

서열번호: 30의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호: 30의 뉴클레오티드 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 67

제65항 또는 제66항의 단리된 핵산을 포함하고, 바이러스 발현 벡터 또는 비-바이러스 발현 벡터인, 발현 벡터.

청구항 68

제67항에 있어서,

발현 벡터가 바이러스 발현 벡터이고, 바이러스 발현 벡터가 렌티바이러스 발현 벡터인, 발현 벡터.

청구항 69

제67항 또는 제68항의 발현 벡터로 형질전환된, 세포.

청구항 70

제55항 내지 제64항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드를 발현하는, 세포.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서,

세포가 면역 이펙터 세포이고,

CAR 폴리펩티드의 발현이 면역 이펙터 세포를 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원을 발현하는 암 세포로 표적화시키는,

세포.

청구항 72

제71항에 있어서,

MHC 클래스 I 단백질이 HLA-A*02 단백질이거나 HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는, 세포.

청구항 73

제71항 또는 제72항에 있어서,

면역 이펙터 세포가 야생형 NPM1을 발현하는 암 세포를 실질적으로 표적화하지 않고/않거나 이의 사멸을 유도하지 않는, 세포.

청구항 74

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,
T 세포인, 세포.

청구항 75

제74항에 있어서,
T 세포가 인간 $CD8^+$ T 세포인, 세포.

청구항 76

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,
자연 살해(NK) 세포인, 세포.

청구항 77

제69항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,
대식세포인, 세포.

청구항 78

제71항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서,
암 세포가 급성 골수성 백혈병(AML) 세포인, 세포.

청구항 79

제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 80

(i) 대상체의 말초 혈액 단핵 세포(PMBC)로부터 세포를 정제하는 단계,
(ii) 선택적으로, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 세포를 활성화시키는 단계,
(iii) 제67항 또는 제68항의 발현 벡터로 세포를 형질도입하는 단계,
(iv) CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 분리하는 단계, 및
(v) 선택적으로, 분리된 세포를 확장시키는 단계
를 포함하는, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포를 제조하기 위한 방법.

청구항 81

(i) 전분화능 줄기 세포(iPSC)를 면역 이펙터 세포로 분화하도록 유도하는 단계,
(ii) 제67항 또는 제68항의 발현 벡터로 면역 이펙터 세포를 형질도입하는 단계,
(iii) CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 분리하는 단계, 및
(iv) 선택적으로, 분리된 면역 이펙터 세포를 확장시키는 단계
를 포함하는, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포를 제조하기 위한 방법.

청구항 82

제81항에 있어서,
면역 이펙터 세포가 NK 세포인, 방법.

청구항 83

제81항에 있어서,

면역 이펙터 세포가 대식세포인, 방법.

청구항 84

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제54항 또는 제79항의 약학 조성물을, 암을 치료하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하는 것인,

방법.

청구항 85

제84항에 있어서,

암이 급성 골수성 백혈병(AML)인, 방법.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서,

암을 치료하는 방법이, 대상체에서 암 부담을 감소시키는 방법 또는 생존을 증가시키는 방법인, 방법.

청구항 87

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제54항 또는 제79항의 약학 조성물을, 급성 골수성 백혈병(AML)을 치료하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는, AML의 치료를 필요로 하는 대상체에서, AML을 치료하는 방법.

청구항 88

제85항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서,

AML이 재발성 AML 또는 불응성 AML인, 방법.

청구항 89

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제54항 또는 제79항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는, AML로부터 관해 중인 대상체에서 AML의 재발을 예방하는 방법.

청구항 90

제84항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서,

투여 단계 전에, 대상체가 NPM1c를 발현하는지의 여부, 또는 대상체가 *NPM1* 유전자에 *NPM1c* 돌연변이를 갖는지 여부를 검출하는 단계 및,

대상체가 NPM1c를 발현하거나 *NPM1c* 돌연변이를 갖는 경우에 투여를 진행하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 91

제84항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서,

투여가 정맥내, 척추강내, 골내 또는 척수내인, 방법.

청구항 92

제84항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 추가 치료제 또는 시술을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서,

추가 치료제가 면역 관문 분자의 억제제이고; 선택적으로 면역 관문 분자가 TIM-3, PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4이고; 선택적으로 억제제가 항체인, 방법.

청구항 94

대상체에서 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서, 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제55항 내지 제64항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제54항 또는 제79항의 약학 조성물의 용도로서,

암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하고;

선택적으로, 용도가 하나 이상의 추가 치료제 또는 시술과 조합되는,

용도.

청구항 95

대상체가 인간인, 제84항 내지 제93항 중 어느 한 항의 방법, 또는 제94항의 용도.

청구항 96

(i) 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제55항 내지 제64항 중 어느 한 항의 CAR 폴리펩티드, 제69항 내지 제78항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제54항 또는 제79항의 약학 조성물;

(ii) 선택적으로, 하나 이상의 추가 치료제, 및

(iii) 대상체에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 지침서

를 포함하는 용기를 하나 이상 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 라이선스 권리 선언문

[0002] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health, NIH)에서 수여한 보조금 번호 CA197605 하의 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0004] 본 출원은 2020년 3월 10일자로 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 62/987,612의 이익을 주장한다. 이의 전체 내용은 참조로 본원에 포함된다.

배경 기술

[0005] 암 치료를 위한 세포-기반 면역요법이 개발되고 있다. T 세포, 단핵구-유래 세포(예를 들어, 대식세포, 수지상 세포) 및 자연 살해(NK) 세포의 입양 세포 전달(adoptive cell transfer)을 사용하는 접근법이 암 치료로서 탐구되는 중이다(예를 들어, 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 참조). 구체적으로, 생체의 활성화/확장된 T 세포를 환자에게 투여하는 입양 세포 요법(ACT)은 현재 테스트되고 있는 암 치료 중 하나이다. (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). 이들 접근법은 생체의 활성화/확장되고 있어서 전이성 종양과 같은 종양을 퇴치하기 위해 재주입되는, 환자로부터 취득된 자가유래 T 세포의 사용을 수반한다. ACT T 세포의 지속성, 생체내 확장 및 이펙터 기능을 향상시키는 전략들이 객관적 반응의 빈도를 증가시키는 데 이용되어 왔다. (Rosenberg SA et al.(2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299; June CH et al.(2007) J Clin Invest 117(5): 1204). ACT T 세포의 기능을 향상시키기 위한 하나의 방법은, 예를 들어 키메라 수용체 또는 공동자극 분자를 도입함으로써 세포 그 자체의 유전 공학을 통한 것이다(예를 들어, 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 참조).

[0006] 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 요법이 암 치료를 위한 전략들 중 하나로서 부상하였다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 항원(예를 들어, 리간드)에 대한 정의된 특이성을 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포, 자연 살해 세포 또는 다른 면역 세포)에 부여하는 유전자-조작된 인공 막횡단 수용체이며, 이는 항원에 대한 인식 및 결합 시, 이펙터 세포의 활성화를 초래한다. 전형적으로, 이들 키메라 수용체는 단클론 항체의 항원 특이성을 당업계에서 CAR T 세포로 지칭되는 T 세포에 제공하기 위해 사용된다. CAR T 세포의 표면에서 조작된 키메라 항원 수용체의 발현은 키메라 수용체에 의해 인식되는 특정 항원의 표면 발현으로 임의의 표적 세포를 용해하는 능력을 T 세포에 부여한다.

[0007] 그러나, 계통(lineage)-제한되거나 종양-관련 항원(TAA)을 표적화하는 현재의 CAR은 정상 조직에서 낮은 항원 발현으로 인해 심각한 독성을 동반할 수 있다(Coulie et al., *NAT REV CANCER* 14: 135(2014); Srivastava & Riddell, *J IMMUNOL* 200: 459(2018) 참조). 더욱이, TAA가 종양 세포 생존에 필요하지 않기 때문에, TAA 발현의 상실은 CAR-T 요법에 대한 종양 저항성의 발달의 주요 원인이다(Srivastava & Riddell, *J IMMUNOL* 200: 459(2018) 참조). 신생항원은 종양-특이적 유전자 돌연변이로부터 유래되며, 이들의 형성 및 발현은 악성 세포에 한정된다(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) 참조). 그러나, 대부분의 신생항원은 면역 편집으로 인해 손실될 수 있는 환자-특이적 패신저(passenger) 돌연변이에 의해 인코딩되어, 종양 면역 회피를 초래한다(Verdegaal et al., *NATURE* 536: 91(2016) 참조). 또한, 현재의 CAR은 주로 표적 세포의 표면 상의 항원에 결합하도록 디자인된다. 실제로, 돌연변이화된 유전자 유래의 대부분의 단백질은 세포 내부에서 발현되어, 통상적인 CAR에 대한 표적으로서 이들을 이용할 수 없게 한다(Uhlen et al., *SCIENCE* 347: 1260419(2015) 참조).

[0008] 급성 골수성 백혈병(AML)에 대한 암 면역요법의 적용은 한정적이었다. AML은 골수에서 이들의 분화가 정지되는 악성 골수 전구 세포의 축적을 특징으로 하는, 신속-진행성 조혈 악성종양이다(van der Lee et al., *J CLIN INVEST* 129: 774(2019); Thomas et al., *BLOOD* 129: 1577(2017) 참조). AML을 위한 현재의 표준 요법은 여전히 집중 화학요법, 및 자가유래 또는 동종이계 조혈모세포 이식(alloSCT)에 의존한다(Dombret & Gardin, *BLOOD* 127: 53(2016); Dohner et al., *N Engl J Med* 373: 1136(2015) 참조). 대부분의 환자가 표준 요법에 반응할 수 있고 완전 관해를 달성할 수 있지만, 이들 환자의 약 50%에서 재발이 발생한다(Ossenkoppele et al., *HAEMATOLOGICA* 101 20(2016) 참조). 집중 화학요법 또는 alloSCT 후 재발 또는 불응성 AML을 가진 환자는 일반적으로 매우 불량한 예후를 가지며(van der Lee et al., *J CLIN INVEST* 129: 774(2019) 참조), 이에 따라 이러한 환자들을 위한 새롭고도, 효과적이며 독성이 덜한 요법을 개발할 확실한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0009] 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0010] 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (a) MHC 클래스 I 단백질 단독 및/또는(b) MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드에 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않고, 선택적으로 대조군 펩티드는 NY-ESO-1 에피토프 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프이다.

[0011] 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (a) MHC 클래스 I 단백질 단독 및 (b) MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드에 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않고, 선택적으로 대조군 펩티드는 NY-ESO-1 에피토프 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프이다.

[0012] 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (a) MHC 클래스 I 단백질 단독, (b) MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드 및/또는 (c) NPM1c 네오에피토프 단백질과 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않고, 선택적으로 대조군 펩티드는 NY-ESO-1 에피토프 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프이다.

- [0013] 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (a) MHC 클래스 I 단백질 단독, (b) MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드 및 (c) NPM1c 네오에피토프 단독과 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않고, 선택적으로 대조군 펩티드는 NY-ESO-1 에피토프 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프이다.
- [0014] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ 를 포함하고, 여기서 X_1 이 A, V, L 또는 I로부터 선택되고, X_2 가 A, T, S, V, L, I, M 또는 Q로부터 선택되고, X_3 이 Q 또는 N 으로부터 선택되고, X_4 가 D 또는 E로부터 선택되고, X_5 가 L, I, V, M, A 또는 F로부터 선택되고, X_6 이 C, S 또는 A로부터 선택되고, X_7 이 L, I, V, M, A 또는 F로부터 선택되고, X_8 이 A, V, L 또는 I로부터 선택되고, X_9 가 L, I, V, M 또는 A로부터 선택된다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ 를 포함하고, 여기서 X_1 이 A 또는 V로부터 선택되고, X_2 가 V, I 또는 L로부터 선택되고, X_3 이 Q 또는 N 으로부터 선택되고, X_4 가 D 또는 E로부터 선택되고, X_5 가 L 또는 I로부터 선택되고, X_6 이 C 또는 S로부터 선택되고, X_7 이 V, L 또는 I로부터 선택되고, X_8 이 A 또는 V로부터 선택되고, X_9 가 V, I 또는 L로부터 선택된다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ 를 포함하고, 여기서 X_1 이 A이고, X_2 가 V, I 또는 L로부터 선택되고, X_3 이 Q이고, X_4 가 D이고, X_5 가 L이고, X_6 이 C이고, X_7 이 L이고, X_8 이 A이고, X_9 가 V, I 또는 L로부터 선택된다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 100개의 아미노산 잔기인 펩티드 내에 있다.
- [0015] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, NPM1c 네오에피토프는 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 또는 AIQDLCLAV(서열번호: 71)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLRK(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75), CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함한다.
- [0016] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 아미노산 잔기이다.
- [0017] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A*02 단백질이거나, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩된다.
- [0018] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은,
- [0019] (i) VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)으로서, 여기서 상기 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3이 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 VH의 CDR이고, CDR이 IMGT에 의해 정의된 것인, 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는
- [0020] (ii) VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)으로서, 여기서 상기 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3이 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 VL의 CDR이고, CDR이 IMGT에 의해 정의된 것인, 경쇄 가변 영역(VL)
- [0021] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0022] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은, VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 VH CDR1은 아미노산 서열 GFTFSSYA(서열번호: 9)를 갖고, VH CDR2는 아미노산 서열 ISGSGGST(서열번호: 10)를 갖고, VH CDR3은 아미노산 서열 ARLGYPTTLLPFDY(서열번호: 11)를 갖는다.
- [0023] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 추가로 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 VL CDR1은 아미노산 서열 QSISSY(서열번호: 6)를 갖고, VL CDR2는 아미노산 서열 AAS(서열번호: 7)를 갖고, VL CDR3은 아미노산 서열 QQSYSTPLT(서열번호: 8)를 갖는다.
- [0024] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 VH가 서열번호: 5의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고/하거나, VL이 서열번호: 3의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나

나 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0025] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 VH가 서열번호: 5의 아미노산 서열을 포함하고/하거나, VL이 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0027] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 단일쇄 Fv(scFv), Fv 단편, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편 또는 단일쇄 항체 분자인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0028] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 scFv인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, scFv는 인간 scFv이다. 일부 양태에서, scFv는 링커를 포함한다. 일부 양태에서, 링커는 펩티드 링커이다. 일부 양태에서, 펩티드 링커는 Gly-Ser 링커이다. 일부 양태에서, Gly-Ser 링커는 (Gly4Ser)(서열번호: 58), (Gly4Ser)₂(서열번호: 59), (Gly4Ser)₃(서열번호: 60) 및 (Gly4Ser)₄(서열번호: 61)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, Gly-Ser 링커는 아미노산 서열 SGSSGGSSSG(서열번호: 4)를 포함한다.
- [0029] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, scFv는 서열번호: 2의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖고; 선택적으로, scFv는, (a) VH 상보성 결정 영역(CDR)1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)으로서, 여기서 VH CDR1이 아미노산 서열 GFTFSSYA(서열번호: 9)를 갖고, VH CDR2가 아미노산 서열 ISGSGGST(서열번호: 10)를 갖고, VH CDR3이 아미노산 서열 ARLGYPTTLLPFDY(서열번호: 11)를 갖는, 중쇄 가변 영역(VH); 및/또는 (b) VL 상보성 결정 영역(CDR)1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)으로서, 여기서 VL CDR1이 아미노산 서열 QSISSY(서열번호: 6)를 갖고, VL CDR2가 아미노산 서열 AAS(서열번호: 7)를 갖고, VL CDR3이 아미노산 서열 QQSYSTPLT(서열번호: 8)를 갖는, 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0030] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, scFv는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0031] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 이는 항체이다. 일부 양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE 항체 동종형으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 항체는 IgG1 동종형 또는 IgG4 동종형이다. 일부 양태에서, 항체는 야생형 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 야생형 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 돌연변이체 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0032] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 항체는 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함하고, 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역은 EU 번호지정에 따라, 다음의 치환: S228P, L235E, L235A 또는 이들의 조합 중 어느 하나를 포함한다.
- [0033] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 항체는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.
- [0034] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 항원은 암 세포의 표면에 있다. 일부 양태에서, 암은 급성 골수성 백혈병(AML)이다.
- [0035] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 0.5 nM 내지 100 nM, 또는 1 nM 내지 15 nM의 평형 해리 상수(K_d)로, 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 결합한다.
- [0036] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 면역 이펙터 세포 상의 제2 항원에 추가로 특이적으로 결합하는, 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 이펙터 세포는 T 세포, 자연 살해 세포 또는 대식세포이다. 일부 양태에서, 제2 항원은 CD3이다. 일부 양태에서, CD3은 T 세포에서 발현되는 인간 CD3이다. 일부 양태에서, 제2 항원은 NKp46이다. 일부 양태에서, NKp46은 NK 세포에서 발현되는 인간 NKp46이다. 일부 양태에서, 제2 항원은 CD16A이다. 일부 양태에서, CD16A는 NK 세포에서 발현되는 인간 CD16A이다. 일부 양태에서, 제2 항원은 CD40, CD47, 4-1BB, TGF-β, LAG-3, PD-1, TIM-3, CTLA-4, OX40, NKp30, NKG2A, NKG2D 또는 DNAM-1이다.
- [0037] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 정제된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0038] 일부 양태에서, 본원은 분리된 핵산을 제공하고, 핵산은 본원에 기재된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코

당하는 핵산 서열을 포함한다.

- [0039] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 단리된 핵산은 서열번호: 12의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 단리된 핵산은 서열번호: 12에 따른 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0040] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0041] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 본원에 기재된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 세포를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0042] 일부 양태에서, 본원은 약학적으로 허용가능한 담체, 및 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 치료적 유효량으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0043] 일부 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 제공한다.
- [0044] 일부 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인, 및 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 제공한다.
- [0045] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 막횡단 도메인은 CD3-제타, CD8, CD28, NKG2D, CD16, NKp44 또는 NKp46의 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 세포내 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 2B4, DAP10, CD137 및 DAP12로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공동자극 분자의 공동자극 도메인을 하나 이상 포함한다.
- [0046] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 CAR 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포내 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인 및 4-1BB 공동자극 도메인을 포함하고; 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인을 포함하고, CAR 폴리펩티드는 CD8 힌지 영역을 추가로 포함한다.
- [0047] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 CAR 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포내 도메인은 서열번호: 27에 따른 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 신호전달 도메인, 및 서열번호: 26에 따른 아미노산 서열을 포함하는 4-1BB 공동자극 도메인을 포함하고; CAR 폴리펩티드는 CD8 막횡단 도메인 및 CD8 힌지 영역을 포함하고, CD8 막횡단 도메인 및 CD8 힌지 영역은 서열번호: 25에 따른 아미노산 서열을 포함하고; 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 서열번호: 23에 따른 아미노산 서열을 포함하는 선도 서열을 포함한다.
- [0048] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 세포외 결합 도메인 내의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 24에 따른 아미노산 서열, 또는 서열번호: 24의 아미노산 서열과 적어도 70% 동일하거나, 적어도 75% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 scFv이다.
- [0049] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 세포내 도메인은 자가-절단 펩티드 서열 및 사이토카인을 추가로 포함하고, 자가-절단 펩티드의 절단은 사이토카인을 방출한다. 일부 양태에서, 사이토카인은 IL-12, IL-7, IL-13, IL-15, TNF- α , IFN- γ 또는 CCL19이다.
- [0050] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 서열번호: 22에 따른 아미노산 서열 또는 서열번호: 22의 아미노산 서열과 적어도 70% 동일하거나, 적어도 75% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, CAR 폴리펩티드를 제공한다.
- [0051] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 양태에서, 단리된 핵산은 서열번호: 30의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호: 30의 뉴클레오티드 서열과 적어도 70% 동일하거나, 적어도 75% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는

단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공하고, 여기서 발현 벡터는 바이러스 발현 벡터 또는 비-바이러스 발현 벡터이다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공하고, 여기서 발현 벡터는 바이러스 발현 벡터이고, 바이러스 발현 벡터는 렌티바이러스 발현 벡터이다.

[0052] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 세포를 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 제공한다. 일부 양태에서, 세포는 면역 이펙터 세포이고, CAR 폴리펩티드의 발현은 면역 이펙터 세포를, 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원을 발현하는 암 세포로 표적화시킨다. 일부 양태에서, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A*2 단백질이거나, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 야생형 NPM1을 발현하는 암 세포를 실질적으로 표적화하지 않고/않거나 이의 사멸을 유도하지 않는다. 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 야생형 NPM1을 발현하는 암 세포를 실질적으로 표적화하지 않는다. 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 야생형 NPM1을 발현하는 암 세포의 사멸을 실질적으로 유도하지 않는다. 일부 양태에서, 세포는 T 세포이다. 일부 양태에서, T 세포는 인간 CD8⁺ T 세포이다. 일부 양태에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 양태에서, 세포는 대식세포이다. 일부 양태에서, 암 세포는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포이다.

[0053] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 세포, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0054] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은, (i) 대상체의 말초 혈액 단핵 세포(PMBC)로부터 세포를 정제하는 단계, (ii) 선택적으로, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 세포를 활성화시키는 단계, (iii) 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 세포를 형질도입하는 단계, (iv) CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 단리하는 단계, 및 (v) 선택적으로, 단리된 세포를 확장시키는 단계를 포함한다.

[0055] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 전분화능 줄기 세포(iPSC)를 면역 이펙터 세포로 분화하도록 유도하는 단계, (ii) 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터로 면역 이펙터 세포를 형질도입하는 단계, (iii) CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 단리하는 단계, 및 (iv) 선택적으로, 단리된 면역 이펙터 세포를 확장시키는 단계를 포함한다.

[0056] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 면역 이펙터 세포는 NK 세포이다. 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 대식세포이다. 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포이다.

[0057] 일부 양태에서, 본원은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하며, 상기 방법은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 세포, 또는 본원에 기재된 약학 조성물을 암을 치료하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 암은 급성 골수성 백혈병(AML)이다. 일부 양태에서, 암을 치료하는 방법은 대상체에서 암 부담을 감소시키는 방법 또는 생존을 증가시키는 방법이다.

[0058] 일부 양태에서, 본원은 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 급성 골수성 백혈병(AML)을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 세포, 또는 본원에 기재된 약학 조성물을, AML을 치료하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, AML은 재발성 AML 또는 불응성 AML이다.

[0059] 일부 양태에서, 본원은 AML로부터 관해 중인 대상체에서 AML의 재발을 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 세포, 또는 본원에 기재된 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0060] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 투여 단계 전에, 대상체가 NPM1c를 발현하는지의 여부, 또는 대상체가 *NPM1* 유전자에 *NPM1c* 돌연변이를 갖는지의 여부를 검출하는 단계, 및 대상체가 NPM1c를 발현하거나

NPM1c 돌연변이를 갖는 경우에 투여를 진행하는 단계를 추가로 포함하는 방법을 제공한다.

- [0061] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 본원은 투여를 정맥내, 척추강내, 골내 또는 척수내로 하는 방법을 제공한다.
- [0062] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 방법은 하나 이상의 추가 치료제 또는 시술을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 추가 치료제는 면역 관문 분자의 억제제이며; 선택적으로 면역 관문 분자는 TIM-3, PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4이고; 선택적으로 억제제는 항체이다.
- [0063] 일부 양태에서, 본원은 대상체에서 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드, 본원에 기재된 세포, 또는 본원에 기재된 약학 조성물의 용도를 제공하고, 여기서, 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하고; 선택적으로, 상기 용도는 하나 이상의 추가 치료제 또는 시술과 조합된다.
- [0064] 전술하거나 관련된 양태 중 임의의 것에서, 대상체는 인간이다.
- [0065] 일부 양태에서, 본원은 (i) 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드, 본원에 기재된 세포, 또는 본원에 기재된 약학 조성물; (ii) 선택적으로, 하나 이상의 추가 치료제, 및 (iii) 대상체에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 지침서를 포함하는 용기를 하나 이상 포함하는 키트를 제공한다.
- [0066] 또 다른 양태에서, 본원은 MHC(예를 들어, MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 기재한다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, MHC(예를 들어, MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (i) 효모 표면 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리 또는 파지 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리를 이용하여 항체에 결합하는 항체 클론을 단리하는 단계, 및 (ii) 항체 클론을, 복수 라운드(2, 3, 4 또는 그 초과 라운드)의 양성 선택(항원에 결합하는 효모 또는 파지 클론 선택하는 것) 및 복수 라운드(2, 3, 4 또는 그 초과 라운드)의 음성 선택(예를 들어, 대조군 펩티드(즉, 네오에피토프와 상이한 펩티드)와 복합체를 이루는 MHC 단백질, 및/또는 단독 MHC 단백질에 결합하는 효모 또는 파지 클론을 추리는 것) 받게 함으로써, 효모 표면 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리 또는 파지 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리를 이용하여 항원에 특이적으로 결합하는 항체 클론을 선택하는 단계에 의해 생성되고; 선택된 항체 클론은 항원에 결합하고, 대조군 펩티드와 복합체를 이루는 MHC 단백질 및/또는 단독 MHC 단백질에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 항원은 이량체형(dimeric) 네오에피토프-MHC 복합체이다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 네오에피토프-MHC 복합체는 NPM1c:HLA-A2이다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1a-1d는 효모 표면 디스플레이에 의한 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 인간 scFv의 단리를 보여준다.

도 1a는 에피토프 펩티드-HLA-A2 복합체, 효모 표면 상에 디스플레이된 scFv 및 효모 세포 표면 상의 scFv에 대한 펩티드-HLA-A2 복합체의 결합의 모식도를 도시한다. 모식도는 문헌 [Chao *et al.*, *NAT PROTOC* 1: 755(2006)]로부터 응용되었다.

도 1b-1 및 1b-2는 AIQ-HLA-A2 복합체를 특이적으로 인식하는 scFv를 디스플레이하는 효모 세포를 단리하기 위해 사용된 전략 및 단계를 도시한다. 선택 라운드는 왼쪽에 표시된다(도 1b-1에 도시된 라운드 1-5 및 도 1b-2에 도시된 라운드 6-9). "항원"은 양성 또는 음성 선택에 사용되는 펩티드-HLA-A2 복합체 또는 단독 HLA-A2를 나타낸다. 처음 두 라운드의 선택에서, 효모 세포는 자기 세포 분류(magnetic cell sorting, MACS)에 의해 선택되었다. 나머지 라운드의 선택에서, 효모 세포는 FITC 표지된 항-c-Myc 항체 및 PE-표지된 항-마우스 IgG 또는 APC-표지된 스트렙타비딘을 이용한 염색을 기반으로 하는 유세포 분석에 의해 분류되었다. 분류된 세포에 대한 게이트가 표시된다. FACS 플롯은 #1 내지 #7로 표시된다.

도 1c-1 및 1c-2는 살아있는 세포에 대한 유세포 분석 데이터(FACS)를 보여준다. 라운드 4 내지 9로부터 분류된 효모 세포를 확장한 후, FITC 표지된 항-c-Myc 항체 및 비오틴-표지된 HLA-A2, GIL-HLA-A2, SLL-HLA-A2 또는 AIQ-HLA-A2에 이어서 APC-표지된 스트렙타비딘으로 염색하고, 살아있는 세포(DAPI 음성)에 대해 유세포 분석 게이트팅하였다. 라운드 4 및 5에 대한 데이터는 도 1c-1에 도시되고, 라운드 6-9에 대한 데이터는 도 1c-2에 도시된다. FACS 플롯은 #1 내지 #29로 표시된다.

도 1d는 유세포 분석 데이터를 보여준다. YG1 또는 YG2 클론을 발현하는 효모 세포를 도 1c에서와 같이 염색하고 분석하였다. 도 1b, 1c 및 1d의 백분율은 게이트 영역에서 세포의 백분율을 나타낸다.

도 2a-2e는 AML 세포 상의 AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 YG1 scFv-Fc의 특이적이고 높은 친화도 결합을 보여준다.

도 2a는 scFv-Fc 융합 단백질을 발현하기 위한 전환가능한 효모 디스플레이/분비 벡터의 모식적인 다이어그램을 도시한다. 이러한 전환가능한 시스템에서, scFv-Fc는 OmeY가 배양물에 첨가되는지 여부에 따라 효모 세포 상에서 분비되거나 디스플레이될 수 있다(Van Deventer *et al.*, *PROTEIN ENG DES SEL* 28: 317 (2015)).

도 2b는 정제된 YG1 scFv-Fc 단백질의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 레인 1: 단백질 사다리, 레인 2: scFv-Fc 단백질(1 µg), 비환원, 레인 3: scFv-Fc 단백질, 환원(1 µg). 겔은 쿠마시 블루(Coomassie Blue)를 사용하여 염색되었다.

도 2c는 OCI-AML3, T2, GMB, PC-3 및 OCI-AML2 세포에 의한 HLA-A2 발현의 유세포 분석 데이터를 보여준다. 어두운 음영 히스토그램: 항-HLA-A2로 염색 및 밝은 음영 히스토그램: 동종형 대조군 항체로 염색.

도 2d는 OCI-AML3, T2, GMB 및 PC-3 세포에 의한 AIQ-HLA-A2 발현의 유세포 분석 데이터를 보여준다. 어두운 음영 히스토그램: YG1 scFv-Fc 및 항-HA로 염색 및 밝은 음영 히스토그램: BSA에 이어서 항-HA로 염색. 3회 반복에 따른 대표적인 데이터가 도시된다.

도 2e는 생물층 간섭기(biolayer interferometry)에 의한 YG1 scFv-Fc, 및 AIQ-HLA-A2, SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2 사이의 상호작용의 동역학적 분석을 보여준다. 포르테바이오(ForteBio) 옥테트 레드(Octet RED) 96의 스트랩 타비딘 바이오센서 팁을 비오틴화된 YG1 scFv-Fc 단백질로 코팅하였다. 팁을, AIQ-HLA-A2, SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2의 농도(결합 곡선 하단에 표시됨)를 증가시키며 이들에 담지시켜 scFv-Fc(화합)에 대한 이들의 결합을 측정 후, 완충액을 함유하는 웰로 옮겨 해리율(해리)을 측정하였다. 세 가지 개별 실험의 대표적인 데이터가 도시된다.

도 3a-3d는 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 NPM1c-CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)의 생성을 보여준다.

도 3a는 scFv(YG1 또는 CD19), CD8 α 세포의 힌지 및 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극 도메인 및 CD3 ζ 활성화 도메인에 이어서 자가-절단 P2A 및 EGFP로 구성된 CAR 벡터의 모식도를 도시한다.

도 3b는 AML 세포 상의 AIQ-HLA-A2 복합체의 NPM1c CAR-T 세포 인식의 모식도를 도시한다.

도 3c는 형질도입되지 않은 T 세포와 형질도입된 T 세포에 의한 CAR 발현의 유세포 분석 데이터를 보여준다. 형질도입된 T 세포를 GFP+ 세포에 대한 분류에 의해 풍부하게 하였고, scFv를 인식하는 AF647-표지된 항-인간 IgG 중쇄 및 경쇄 항체로 확장 및 염색하였다. 형질도입되지 않은 T 세포를 분류 없이 활성화 및 확장시켰다. 살아있는 세포(DAPI⁻)의 GFP 대 항-인간 IgG 염색 프로파일이 도시된다.

도 3d는 NPM1c CAR-T 세포가 AIQ-HLA-A2 복합체를 인식한다는 것을 보여주는 유세포 분석 데이터를 도시한다. 형질도입되지 않은 T 세포 및 형질도입된 T 세포를 비오틴화된 AIQ-HLA-A2 또는 SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2 복합체와 함께 항온처리하였고, 그 후 스트랩타비딘-APC 염색하였다. 살아있는(DAPI⁻) 형질도입되지 않은 T 세포, NPM1c CAR-T 세포 및 CD19 CAR-T 세포의 GFP 대 스트랩타비딘-APC 염색 프로파일이 도시된다. 도 3c 및 3d의 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험을 대표한다. 백분율은 게이트된 영역에서 세포의 백분율을 나타낸다.

도 4a-4j는 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)가 시험관내에서 HLA-A2+ NPM1c+ 인간 AML 세포를 특이적으로 사멸시킨다는 것을 보여준다.

도 4a-4b는 NPM1c CAR-T 세포가 시험관내에서 표적 세포를 사멸시킨다는 것을 보여준다. NPM1c CAR-T 세포를 OCI-AML3, GMB 및 PC-3 종양 세포와 함께 표시된 이펙터:표적(E:T) 비율로 24시간 동안 공동-배양하였다. 세포 혼합물을 CD8 및 CD33, CD19 또는 mCherry에 대해 염색한 후 유세포 분석하였다. CAR-T 세포의 백분율을 CD8 염색에 의해 정량화하였고, OCI-AML3 세포의 백분율을 CD33에 의해 정량화하였고, GMB 세포를 CD19에 의해 정량화하였고, PC-3을 mCherry에 의해 정량화하였다. 종양 세포의 특이적 용해 백분율을 계산하였다(식의 경우 실시예에서 물질 및 방법 섹션 참조). 상이한 E:T 비율에서 CD8 대 CD33, CD19 또는 mCherry 염색 프로파일(도 4a) 및 특정 용해 비율(도 4b)의 예가 도시된다. 게이트 영역에서의 세포의 백분율이 표시된다. p 값은 동일한 E:T 비율에서 NPM1c CAR-T 세포와 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 비교를 나타낸다.

도 4c는 CAR-T 세포와 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 IFN-γ 및 IL-2 발현의 비교를 보여준다. NPM1c CAR-T

세포 및 형질도입되지 않은 T 세포를 12시간 동안 모넨신 및 브레펠딘 A의 존재 하에 OCI-AML3, GMB 또는 PC-3과 함께 공동-배양하였다. 세포를 CD3에 대해 염색한 후, 막투과화(Permeabilize)시키고, 세포내 IFN- γ 또는 IL-2에 대해 염색하였으며, 이어서 유세포 분석하였다. IFN- γ^+ 또는 IL-2 $^+$ NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포의 백분율이 도시된다. p 값이 표시된다.

도 4d는 NPM1c CAR-T 세포가 NPM1c $^+$ HLA-A2 $^+$ 표적 세포에 의해 다중 사이토카인을 분비하도록 자극됨을 보여준다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 NPM1c $^+$ HLA-A2 $^+$ OCI-AML3 세포와 함께 16시간 동안 공동-배양하였다. 배양 상청액을 수집하였고, 쿼란티바디 휴먼 사이토카인 어레이(Quantibody Human Cytokine Array)를 이용하여 동시에 20개의 상이한 사이토카인에 대해 검정하였다. 각각의 사이토카인은 4회 거듭한 항체 스팟을 함유하였다. 4명의 상이한 건강한 공여자 유래의 T 세포를 개별적으로 분석하였다. n = 4회 반복한 항체 스팟; 그래프 막대 및 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다; p 값이 표시된다.

도 4e-4f는 NPM1c $^+$ HLA-A2 $^+$ 표적 세포에 반응하여 NPM1c CAR-T 세포가 증식함을 보여준다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 5일 동안 OCI-AML3 세포와 함께 공동-배양하였다. CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포의 절대 세포 수를 정밀 계수 비드를 사용하여 유세포 분석에 의해 결정하였다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포에 의한 Ki-67 발현을 세포내 염색 후 유세포 분석에 의해 검정하였다. **도 4e**는 5일차에 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포의 개수 비교를 제공한다. **도 4f**는 형질도입되지 않은 T 세포 및 NPM1c CAR-T 세포 사이의 세포내 Ki-67 염색의 평균 형광 강도(MFI)의 비교를 제공한다. p 값은 NPM1c CAR-T 세포와 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 비교를 나타낸다; n = 5개의 생물학적으로 독립적인 샘플이다; 그래프 막대 및 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다.

도 4g-4h는 NPM1c CAR-T 세포가 시험관내에서 HLA-A2 $^+$ NPM1c $^+$ 인간 종양 세포를 특이적으로 사멸시킨다는 것을 보여준다. OCI-AML2(HLA-A2 양성) 및 PC-3(HLA-A2 음성) 세포를 NPM1c(렌티-NPM1c) 또는 빈 음성 대조군(렌티-NC)을 발현하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 분류 및 확장시켰다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포에 의한 형질도입 또는 대조군 OCI-AML2 세포(**도 4g**) 및 PC-3 세포(**도 4h**)의 특이적 사멸의 비교가 도시된다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 24시간 동안 표시된 E:T 비율로 형질도입 또는 대조군 OCI-AML2 또는 PC-3 표적 세포와 함께 공동-배양하였다. 표적 세포 사멸을 생존 표적 세포의 루시페라제 활성을 검정함으로써 측정하였다. 상이한 E:T 비율에서 종양 세포의 특이적 용해의 백분율을 계산하였다. 각 반응에서의 표적 세포 및 T 세포가 도시된다.

도 4i는 상이한 농도의 AIQ 펩티드(왼쪽 패널) 또는 SLL 펩티드(오른쪽 패널)로 펄스된 T2 세포에 대한 YG1 scFv-FC 결합의 유세포 분석에 따른 분석을 보여준다.

도 4j는 NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포에 의한 상이한 농도의 AIQ(왼쪽 패널) 또는 SLL(오른쪽 패널) 펩티드로 펄스된 T2 세포의 특이적 사멸의 비교를 보여준다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 24시간 동안 표시된 E:T 비율로 펩티드-펄스된 T2 표적 세포와 함께 공동-배양하였다. 표적 세포 사멸을 생존 표적 세포의 루시페라제 활성을 검정함으로써 측정하였다. p 값은 동일한 E:T 비율에서 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 비교를 나타낸다; n=3개의 생물학적으로 독립적인 샘플이다; 데이터 포인트 및 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다.

도 5a-5h는 NPM1c CAR-T(YG1 scFv 포함) 요법이 NPM1c-양성 AML 세포를 갖는 마우스에서 백혈병 부담을 감소시키고 생존을 연장하지만, NPM1c-음성 AML 세포의 경우 그렇지 않음을 보여준다.

도 5a는 실험 디자인을 보여준다: NSG 마우스에 OCI-AML3 세포(1×10^6) 또는 GMB 세포(2×10^6)를 정맥내 주사하였고(D-4), 4일 후 생착에 대해 영상화하였으며(D0); 그 후에 마우스에 1×10^7 NPM1c CAR-T 세포, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19 CAR-T 세포를 정맥내 주사하였다. 마우스를 3일마다 생물발광 영상화에 의해 모니터링하여 종양 부담 및 생존을 평가하였다.

도 5b는 T 세포(n=5) 주사 후 표시된 일자(D0에서 D18)에 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 마우스들 사이의 생물발광 영상화에 의해 측정된, OCI-AML3 백혈병 부담의 비교를 보여준다. 각각의 실험 그룹에 대한 총 플럭스(flux)(전신적인 OCI-AML3 백혈병 세포로부터의 루시페라제 신호)의 비교가 도시된다. 실험은 그룹당 4 또는 5마리의 마우스로 2회 반복되었다.

도 5c는 도 5b에서와 같이 NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 마우스의 카플란 마이어 (Kaplan Meier) 생존 곡선(n=9)을 보여준다. P 값이 표시된다.

도 5d는 T 세포 주사(n=3-5) 후 표시된 일자(D0 내지 D21)에 NPM1c CAR-T 세포, 형질도입되지 않은 T 세포 및 CD19 CAR-T 세포로 처리된 마우스들 사이의 생물발광 영상화에 의해 측정된, GMB 림프종 부담의 비교를 보여준다. 각각의 실험 그룹에 대한 총 플럭스(전신적인 GMB 세포로부터의 루시페라제 신호)의 비교가 도시된다. 실험은 그룹당 3-5마리의 마우스로 2회 반복하였다. 총 플럭스에 대한 P값은 다음과 같다: 형질도입되지 않은 T 대 NPM1c CAR-T p=0.992; CD19 CAR-T 대 형질도입되지 않은 T p=0.003; CD19 CAR-T 대 NPM1c CAR-T p=0.047.

도 5e는 도 5d에서와 같이 NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19 CAR-T 세포로 처리된 마우스의 카플란 마이어 생존 곡선(n=3-5)을 보여준다. P 값: 형질도입되지 않은 T 대 NPM1c CAR-T p=0.124; CD19 CAR-T 대 형질도입되지 않은 T p=0.012; 및 CD19 CAR-T 대 NPM1c CAR-T p=0.015.

도 5f는 T 세포/PBS 주사(n=3-4) 후 표시된 일자(D0 내지 D21)에 NPM1c CAR-T 세포, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 PBS 제공된 마우스에서 생물발광 영상화에 의해 측정된, OCI-AML3 백혈병 부담의 비교를 제공한다. 총 플럭스(전신적인 OCI-AML3 세포로부터의 루시페라제 신호)의 비교가 도시된다. P 값은 PBS 대 형질도입되지 않은 T p=0.395; PBS 대 NPM1c CAR-T p=0.018; 및 형질도입되지 않은 T 대 NPM1c CAR-T p=0.011이다.

도 5g는 T 세포 주사 후 표시된 일자(D0 내지 D21)에 NPM1c CAR-T 세포(n=5) 및 형질도입되지 않은 T 세포(n=5)로 처리된 마우스들 사이의 생물발광 영상화에 의해 측정된, OCI-AML2 백혈병 부담의 비교를 제공한다. 총 플럭스(전신적인 OCI-AML2 세포로부터의 루시페라제 신호)의 비교가 도시된다.

도 5h는 NPM1c CAR-T 세포(n=5) 또는 형질도입되지 않은 T 세포(n=5)로 처리된 도 5g에 나타난 마우스의 카플란 마이어 생존 곡선을 제공한다. 데이터 포인트 및 오차 막대는 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다. p 값이 표시된다.

도 6a-6i는 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)가 혈액, 비장, 골수 및 간에서 백혈병 부담을 감소시킨다는 것을 보여준다.

도 6a는 OCI-AML3 AML 세포를 주사한 후 형질도입되지 않은 T 세포 또는 NPM1c CAR-T 세포를 주사한 NSG 마우스들 사이의 생물발광 영상화에 의해 측정된, OCI-AML3 백혈병 부담의 비교를 보여준다. 총 플럭스(전신적인 OCI-AML3 세포로부터의 루시페라제 신호)의 비교가 도시된다. 마우스(n=5)는 T 세포 주입일(0일) 및 18일 후에 영상화되었다.

도 6b-6c는 도 6a에 나타난 마우스로부터 수득된 세포 집단에 대한 게이팅 전략 및 발현 프로파일을 보여주는 대표적인 유세포 분석 플롯을 보여준다. 혈액, 비장, 골수 및 간을 18일차에 수확하였고, 단일 세포 현탁액을 제조하였으며, 마우스 CD45 및 인간 CD45, CD8, CD33, PD-1 및 Tim-3에 대해 염색한 후 유세포 분석하였다. 혈액과 비장(도 6b) 및 골수와 간(도 6c)에 대한 대표적인 염색 프로파일 및 게이팅 전략이 도시되며, 이는 살아 있는 세포(DAPI⁻)에 대한 mCD45 대 hCD45 게이팅; hCD45⁺ 세포에 대한 hCD33 대 hCD8 게이팅; hCD8⁺ 세포에 대한 hPD-1 대 hCD8 게이팅; 및 hCD8⁺ 세포에 대한 hTim-3 대 hCD8 게이팅을 포함한다. 숫자는 게이트 영역에서의 세포의 백분율을 나타낸다.

도 6d는 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포가 제공된 마우스들 사이의 상이한 조직에서 hCD33⁺ 백혈병 세포 및 hCD8⁺ T 세포의 전체 개수의 비교를 보여준다(왼쪽의 막대는 형질도입되지 않은 T 세포를 이용한 처리를 나타내고, 오른쪽의 막대는 NPM1c CAR-T 세포를 이용한 처리를 나타냄).

도 6e는 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포가 제공된 마우스들 사이의 상이한 조직에서 hCD45⁺ 세포 중 hCD8⁺ T 세포 및 hCD33⁺ 백혈병 세포의 백분율의 비교를 보여준다(왼쪽의 막대는 형질도입되지 않은 T 세포를 이용한 처리를 나타내고, 오른쪽의 막대는 NPM1c CAR-T 세포를 이용한 처리를 나타냄).

도 6f는 NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포가 제공된 마우스들의 상이한 조직에서 hCD33⁺ 백혈병 세포에 대한 hCD8⁺ T 세포의 백분율의 비율을 보여준다(여기서 왼쪽 막대는 형질도입되지 않은 T 세포를 이용한 처리를 나타내고, 오른쪽 막대는 NPM1c CAR-T 세포를 이용한 처리를 나타냄).

도 6g-6h는 상이한 조직에서 인간 CD8⁺ T 세포 중 PD1⁺ T 세포(도 6g) 또는 Tim-3⁺ T 세포(도 6h)의 백분율을 보

여준다(여기서 왼쪽의 막대는 형질도입되지 않은 T 세포를 이용한 처리를 나타내고, 오른쪽의 막대는 NPM1c CAR-T 세포를 이용한 처리를 나타냄). P 값은 도 6a, 6d, 6e, 6f, 6g 및 6h에 표시된다(n=5).

도 6i는 NPM1c CAR T 세포가 CAR-T 세포 주사 30일 후에 골수에서 백혈병 세포를 효과적으로 제거한다는 것을 보여준다. NSG 마우스에 OCI-AML3을 이식하였고, 4일 후 NPM1c CAR-T 세포, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 PBS를 주사하였다(**도 5f**에 도시된 바와 같은 마우스). T 세포 주사 30일 후, 세포를 생존한 마우스의 골수로부터 수확하였다. 세포를 마우스 CD45 및 인간 CD45, CD8 및 CD33에 대해 염색한 후, 유세포 분석하였다. 전체 세포의 FSC 대 DAPI 염색 프로파일(왼쪽), 살아있는(DAPI⁻) 세포에 대해 게이팅한 hCD45 대 mCD45 염색 프로파일(중간) 및 hCD45⁺ 세포의 hCD33 대 hCD8 염색 프로파일(오른쪽)이 도시된다. 숫자는 게이트 영역에서의 세포의 백분율을 나타낸다.

도 7a-7g는 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)가 시험관내 및 생체내에서 원발성 인간 AML 아세포를 효과적으로 사멸시키지만, 정상 인간 HLA-A2⁺ CD34⁺ 조혈 줄기/전구 세포(HSPC)에게 세포독성을 나타내지 않는다는 것을 보여준다.

도 7a는 NPM1c CAR-T 세포가 시험관내에서 3명의 공여자 유래의 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 원발성 AML 아세포를 사멸시키는 것을 보여준다. NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 표시된 비율로 24시간 동안 AML 아세포와 함께 항온처리하였다. AML 아세포의 절대 수를 CD8 및 CD33에 대한 염색 후 정밀 계수 비드를 이용해 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 상이한 E:T 비율에서 종양 세포의 특이적 용해의 백분율을 계산하였고; n=3 생물학적 복제물이며; 그래프 막대 및 오차 막대는 평균 ± 표준오차를 나타내고; p 값이 표시된다.

도 7b는 HSPC에 의한 HLA-A2 발현의 유세포 분석에 따른 분석을 보여준다. 이지셉(EasySep) 인간 CD34 양성 선택 키트를 사용하여 2명의 공여자 태아 간으로부터 인간 CD34⁺ HSPC를 정제하였다. 어두운 히스토그램: 항-HLA-A2로 염색 및 밝은 히스토그램: 동종형 대조군 항체로 염색. 기술적인 3회 반복의 대표적인 데이터가 도시된다.

도 7c는 YG1 scFv-Fc 결합에 대한 HSPC의 유세포 분석에 따른 분석을 보여준다. 어두운 음영 히스토그램: YG1 scFv-Fc 및 항-HA로 염색 및 밝은 음영 히스토그램: BSA에 이어서 항-HA로 염색. 기술적인 3회 반복으로 세 가지 개별 실험의 대표적인 데이터가 도시된다.

도 7d는 NPM1c CAR-T 세포가 HLA-A2⁺ CD34⁺ HSPC를 사멸시키지 않는다는 것을 보여준다. NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포를 표시된 E:T 비율로 24시간 동안 HSPC와 함께 항온처리하였다. 세포 혼합물을 CD8 및 CD34에 대해 염색하였고, 정밀 계수 비드를 이용해 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 상이한 E:T 비율에서 CD8(T 세포) 대 CD34(HSPC) 염색 프로파일의 예가 도시된다. 게이트 영역에서의 세포의 백분율이 표시된다.

도 7e는 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 상이한 E:T 비율에서의 특이적 용해의 비교를 보여주고; p 값은 동일한 E:T 비율에서 NPM1c CAR-T 세포와 형질도입되지 않은 T 세포 사이의 비교를 나타내며; n=3 생물학적 복제물이고; 데이터 포인트와 오차 막대는 평균 ± 표준오차를 나타낸다.

도 7f는 NPM1c CAR-T 세포 처리가 원발성 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ AML 이종이식편에서 백혈병 부담을 감소시킨다는 것을 보여준다. NSGS 마우스에 인간 AML 아세포를 이식하였다. 2주 후 혈액에서 AML 아세포가 검출가능했을 때, 마우스에 NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 제공하였다. T 세포 전달 후 표시된 일자에 마우스를 채혈하고 단핵 세포를 mCD45, hCD45 및 hCD8에 대해 염색하였다. hCD8⁻ 살아있는 세포에 대해 게이팅한 대표적인 hCD45 대 mCD45 염색 프로파일이 도시된다. AML 아세포는 hCD45⁺ hCD8⁻이었다. 숫자는 게이트 영역에서의 세포의 백분율을 나타낸다.

도 7g는 NPM1c CAR-T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포가 제공된 마우스들 사이의 말초 혈액에서 hCD45⁺CD8⁻ AML 아세포의 백분율의 비교를 보여주고, 여기서 AML 아세포의 수준을 T 세포 주입(0일차) 전, 그리고 T 세포 주사 9일 후 및 18일 후에 측정하였다. 왼쪽 막대는 형질도입되지 않은 T 세포를 이용한 처리를 나타내고, 오른쪽 막대는 NPM1c CAR-T 세포를 이용한 처리를 나타내고; 그래프 막대 및 오차 막대는 평균 ± 표준오차를 나타내고; p 값(양측 독립적 샘플 t-테스트)이 표시된다(n=5).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 본원은 HLA-A2와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프에 특이적이고 높은 친화도로 결합하는 단일쇄 가변 항체 단편(scFv)의 동정에 적어도 부분적으로 기초한다. 본원은 HLA-A2와 복합체를 이루는 이러한 NPM1c 네오에피토프에 결합하는 신규한 scFv, 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 또한, 본원은 HLA-A2와 복합체를 이루는 이러한 NPM1c 네오에피토프에 특이적으로 결합하고 또 다른 표적에 추가로 결합하는 본원의 scFv에 기초한 이중 특이적 결합 분자를 제공한다.
- [0069] 또한, 본원은 HLA-A2와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 제공한다.
- [0070] 추가로, 본원은 HLA-A2와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 T 세포를 제공한다. 본원에 기재되고 본원에 제시된 실시예에 나타난 바와 같이, HLA-A2와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 T 세포는, AML 마우스 모델에서, *생체내* 생존을 연장하고, 백혈병 부담을 감소시키고, *시험관내*에서 AML 세포를 특이적으로 사멸시킨다.
- [0071] 따라서, 본원에 기재된 항체 및 이의 항원 결합 단편, 이중특이적 분자, CAR 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드를 발현하는 T 세포는 NPM1c 돌연변이를 가진 암을 치료하는 데 표적화된 면역요법에 유용하다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체 및 이의 항원 결합 단편, CAR 폴리펩티드 및 CAR 폴리펩티드를 발현하는 T 세포는 급성 골수성 백혈병(AML)을 치료하는 데 표적화된 면역요법에 유용하다. 하나의 양태에서, 본원은 그러한 에피토프가 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이룰 경우 (또는 이에 의해 제시될 경우), NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 그러한 에피토프가 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이룰 경우, 하기 아미노산 서열을 갖는 네오에피토프 중 하나 이상에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다: AIQDLCLAV(서열번호: 1), AIQDLCVAV(서열번호: 71), CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75), CLAVEEVSLRK(서열번호: 76). 하나의 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질 단독과 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드(예를 들어, 대조군 펩티드는 NY-ESO-1 에피토프(예를 들어, 서열번호: 62를 포함하는 펩티드)) 또는 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프(예를 들어, 서열번호: 63을 포함하는 펩티드)와 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 NPM1c 네오에피토프 단독(MHC 클래스 I 단백질 없음)과 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)을 포함하고, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)이다. 일부 양태에서, 항원은 암 세포의 표면 상에 있다(예를 들어, 여기서 암은 NPM1c+이고, 예를 들어, 암이 AML임). 하나의 양태에서, 본원은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이하에 기재된다.
- [0072] 하나의 양태에서, 본원은 (i) 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인 및 (ii) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 분자를 제공한다. 일부 양태에서, 제2 항원은 T 세포 또는 자연 살해 세포 상에서 발현되는 항원이다. 일부 양태에서, 제2 항원은 CD3(예를 들어, 인간 CD3), NKp46(예를 들어, 인간 NKp46) 또는 CD16A(예를 들어, 인간 CD16A)이다. 하나의 양태에서, 본원은 (i) HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인 및 (ii) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 분자를 제공한다. 본원에 제공된 이중특이적 분자는 이하에 기재된다.
- [0073] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 이중특이적 분자 (및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본원에 제공된 약학 조성물은 이하에 기재된다.
- [0074] 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포외 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)

폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자를 포함한다. 본원에 제공된 CAR 폴리펩티드는 이하에 기재된다.

[0075] 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포의 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자를 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공한다. 하나의 양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포(예를 들어, $CD8^+$ T 세포), 자연 살해 세포 또는 대식세포이다. 하나의 양태에서, CAR 폴리펩티드의 발현은 면역 이펙터 세포를, 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 이의 표면 상에서 디스플레이하는 암 세포(예를 들어, 여기서 암은 AML)로 표적화시킨다. 하나의 양태에서, CAR 폴리펩티드의 발현은 면역 이펙터 세포를, HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 이의 표면 상에서 디스플레이하는 암 세포(예를 들어, 여기서 암은 AML)로 표적화시킨다. 본원에 제공된 면역 이펙터 세포는 이하에 기재된다.

[0076] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 면역 이펙터 세포 (및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0077] 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하고, 상기 방법은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포 표면이 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열을 디스플레이하고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포 표면이 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열을 디스플레이하고, 상기 방법이 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0078] 일부 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 NPM1c-양성 암을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 NPM1c-양성 암을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0079] 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 AML을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본원은 대상체(예를 들어, 인간)에서 AML을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0080] 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 제공된 CAR 폴리펩티드, 본원에 제공된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포 및 이를 포함하는 본원에 제공된 약학 조성물을 이용한 치료 방법, 이들의 용도 및 이들을 포함하는 키트가 이하에 기재된다.
- [0081] 또한, 본원은 MHC 단백질(특히, MHC 클래스 I 단백질, 예컨대 HLA-A2)과 복합체를 이루는 네오에피토프(특히, 암 네오에피토프)에 특이적으로 결합하는 scFv의 동정에 적어도 부분적으로 기초한다. 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편의 개발과 관련된 많은 난제가 있기 때문에 이러한 특이적이며 높은 친화도의 항체의 단리는 놀라운 것이었다. 특히, 네오에피토프 펩티드는 MHC 단백질로부터 쉽게 해리되며, 이는 복합체에 특이적인 항체를 생성하기 어렵게 한다. 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 효모 표면 디스플레이 방법론을 이용하여, MHC 단백질 단독 또는 대조군 펩티드와 복합체를 이루는 MHC 단백질 결합 없이 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 효모 집단의 복수 라운드의 양성 및 음성 선택의 이용이 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 scFvs의 동정으로 이어졌음이 발견되었다. 선택 단계는 실시예 1 및 부록 1에 기재된다. 어떠한 이론에도 얽매이지 않고, 또한 항원으로서 이량체성 네오에피토프-MHC 복합체의 사용이 높은 친화도의 특정 scFv의 성공적인 단리에 기여했을 수 있다.
- [0082] 따라서, 하나의 양태에서, 본원은 MHC(예를 들어, MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프(예를 들어, 암 네오에피토프)를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은, 효모 표면 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리 또는 파지 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리를 사용하여 생성되고, 선택적으로 복수 라운드(2, 3, 4 또는 그 초과 라운드)의 양성 선택(항원에 결합하는 효모 또는 파지 집단을 선택하는 것) 및 복수 라운드(2, 3, 4 또는 그 초과 라운드)의 음성 선택(예를 들어, 대조군 펩티드(즉, 네오에피토프와 상이한 펩티드)와 복합체를 이루는 MHC 단백질 및/또는 MHC 단백질 단독과 결합하는 효모 또는 파지 집단을 추리는 것)을 이용하여, 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적인 바인더용으로 풍부해진다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 효모 표면 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리 또는 파지 디스플레이 항체(예를 들어, scFv) 라이브러리를 사용하여 생성되고, 선택적으로 복수 라운드(적어도 3, 적어도 4 또는 적어도 5 라운드)의 양성 선택(항원에 결합하는 효모 또는 파지 집단을 선택하는 것) 및 복수 라운드(적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4)의 음성 선택(예를 들어, 대조군 펩티드와 복합체를 이루는 MHC 단백질 및/또는 MHC 단백질 단독과 결합하는 효모 또는 파지 집단을 추리는 것(예를 들어, MHC 단백질 단독과 결합하는 효모 또는 파지 집단을 적어도 2 라운드로 추리는 것, 및 대조군 펩티드와 복합체를 이루는 MHC 단백질과 결합하는 효모 또는 파지 집단을 적어도 2 라운드로 추리는 것))을 이용하여, 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적인 바인더용으로 풍부해진다. 특정 실시양태에서, 세포 집단은 선택 단계 후(예를 들어, 양성 선택 단계 또는 단계들 이후, 음성 선택 단계 또는 단계들 이후, 또는 각각의 선택 단계 이후)에 확장된다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 항원은 (특히, 예를 들어, IgG Fc, 예를 들어, 마우스 또는 인간 IgG1를 통해 함께 연결된 2개의 네오에피토프:MHC 분자를 갖는) 이량체성 네오에피토프-MHC 복합체이다. 특정 실시양태에서, 효모 디스플레이 방법론 및 라이브러리가 이용된다. 특정 실시양태에서, 양성 선택은 항원(네오에피토프-MHC 복합체) 및 항체(예를 들어, scFv) 둘 모두에 대해 염색하는 효모 또는 파지 집단에 대한 선택(예를 들어, 적어도 1 또는 적어도 2 라운드의 선택)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 효모 또는 파지 집단은 표지된 항원 및 항체/단편(예를 들어, scFv) 분자를 이용하는 자기 분류(MACS) 및/또는 유세포 분석 분류에 의해 선택된다. 예를 들어, 항원은 비오틴을 항원(형광단에 접합된 스트렙타비딘과 같은 2차 작용제에 의해 검출될 수 있음)에 공유적으로 부착함으로써 비오틴화되고/되거나 IgG 분자(IgG에 대해 특이적인 표지된 항체에 의해 검출됨)에 결합되고, 항체(예를 들어, scFv)는 에피토프 태그(예를 들어, 혈구응집소 또는 c-Myc)(에피토프 태그에 대해 형광성으로 표지된 항체에 의해 검출됨)에 결합된다. 하나의 실시양태에서, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9회의 하기 선택 단계가 네오에피토프-MHC 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기 위해 이용된다: (i) (예를 들어, 표지된 네오에피토프-MHC 복합체를 통해 선택함으로써) 표지된 네오에피토프-MHC 복합체에 결합하는 항체-보유 클론/세포의 양성 선택, (ii) (예컨대, 표지된 대조군 펩티드-MHC 복합체에 의해 미결합된 항체-보유 클론/세포를 선택함으로써) 대조군 펩티드-MHC 복합체에 결합하는 항체-보유 클론/세포의 음성 선택(추리는 것), (iii) (예를 들어, 항체(예를 들어, scFv) 및 네오에피토프-MHC 복합체에

대해 이중 양성 염색된 항체 보유 클론/세포를 선택함으로써) 네오에피토프-MHC에 결합하는 항체-보유 클론의 양성 선택, (iv) (예를 들어, 표지된 네오에피토프-MHC 복합체로 염색되고, 선택적으로 항체에 대해 염색된 항체-보유 클론/세포를 선택함으로써) 표지된 네오에피토프-MHC 복합체에 결합하는 항체-보유 클론/세포의 양성 선택, (v) (예컨대 표지된 대조군 펩티드-MHC 복합체 또는 표지된 MHC 단백질에 의해 미결합된 항체-보유 클론/세포를 선택함으로써) 대조군 펩티드-MHC 복합체 또는 MHC 복합체 단독과 결합하는 항체-보유 클론/세포의 음성 선택(추리는 것), (vi) (예를 들어, 네오에피토프-MHC 복합체에 대해 염색된 항체 보유 클론/세포를 선택하거나, 항체(예를 들어, scFv) 발현 및 네오에피토프-MHC 복합체에 대해 이중 양성 염색된 항체 보유 클론/세포를 선택함으로써) 네오에피토프-MHC에 결합하는 항체-보유 클론의 양성 선택, (vii) (예컨대 표지된 MHC 단백질에 의해 미결합된 항체-보유 클론/세포를 선택함으로써) MHC 복합체 단독에 결합하는 항체-보유 클론/세포의 음성 선택(추리는 것), (viii) (예를 들어, 항체(예를 들어, scFv) 및 네오에피토프-MHC 복합체에 대해 이중 양성 염색된 항체 보유 클론/세포를 선택함으로써) 네오에피토프-MHC에 결합하는 항체-보유 클론의 양성 선택, (ix) (예컨대 표지된 MHC 단백질에 의해 미결합된 항체-보유 클론/세포를 선택함으로써) MHC 복합체 단독에 결합하는 항체-보유 클론/세포의 음성 선택(추리는 것). 앞의 문장에 기재된 적어도 5, 6, 7, 8 또는 9 단계는 적어도 2개의 양성 선택 단계 및 적어도 2개의 음성 선택 단계를 포함하는 특정 항체 또는 단편 선택 과정에 이용된다. 일부 실시양태에서, 적어도 6, 7, 8 또는 9 단계는 네오에피토프-MHC 복합체의 경우 적어도 2개(바람직하게는, 적어도 3개)의 양성 선택 단계, 대조군 펩티드-MHC-복합체에 결합하는 클론/세포를 추리기 위해 적어도 1개(바람직하게는, 적어도 2개)의 음성 선택 단계, 및 MHC 단백질 단독에 결합하는 클론/세포를 추리기 위해 적어도 1개(바람직하게는, 적어도 2개)의 음성 선택 단계를 포함하는 특정 항체 또는 단편 선택 과정에 이용된다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, MHC 단백질은 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)이다. 이러한 양태의 특정 실시양태에서, 네오에피토프는 NPM1c 네오에피토프이다. 특정 실시양태에서, 네오에피토프-MHC 복합체는 NPM1c:MHC 클래스 I(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)이다. 이러한 양태의 일부 실시양태에서, 네오에피토프는 본원에 참조된 임의의 NPM1c 에피토프(예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 아미노산 서열을 갖는 에피토프)이다. 특정 실시양태에서, 네오에피토프-MHC 복합체는 AIQDLCLAV:HLA-A2이다. 일부 실시양태에서, 네오에피토프-MHC 복합체에 대해 특이적인 항체 또는 항원 결합 단편은 이하의 부록 1에 언급된 임의의 4, 5, 6, 7, 8 또는 모든 선택 단계를 사용하여 수득된다. 일부 실시양태에서, 효모 표면 디스플레이 또는 파지 표면 디스플레이 방법론 및 라이브러리 대신에, 박테리아 디스플레이, 진핵생물 바이러스 디스플레이, 포유류 세포 디스플레이 또는 무세포(예를 들어, 리보솜 디스플레이) 항체 스크리닝 기술이 사용된다. 효모 표면 디스플레이 방법론 및 라이브러리는 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Chao et al., 2006, Nature Protocols 1(2):755-768 참조). 파지 디스플레이 방법론 및 라이브러리는 당업계 문헌 [Merz et al.(1995) *J Neurosci Methods* 62(1-2):213-9; Di Niro et al.(2005) *Biochem J* 388(Pt 3):889-894; 및 [Engberg et al.(1995) *Methods Mol Biol* 51:355-376]에서 알려져 있다.

[0083] 항체

[0084] 하나의 양태에서, 본원은 MHC 단백질(예를 들어, MHC 클래스 I 단백질)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프(예를 들어, 암 네오에피토프)를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법(예를 들어, 효모 표면 디스플레이 방법론 또는 파지 디스플레이 방법론 등에 의하여 특정 바인더를 동정하기 위해 복수 라운드의 선택 단계를 사용하는 것; 또한 선택적으로, 항원으로서 이량체성 네오에피토프-MHC 복합체를 사용하는 것; 예를 들어, 항체 생산을 유도하기 위해 항원으로서 이량체성 네오에피토프-MHC 복합체 또는 네오에피토프-MHC 복합체로 대상체를 면역화하는 것) 중 하나에 의해 수득되는 MHC 단백질(예를 들어, MHC 클래스 I 단백질)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프(예를 들어, 암 네오에피토프)를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법 중 하나에 의해 수득되는 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는 단백질 또는 HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 암 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 MHC 단백질 단독과 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 MHC 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드와 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 하나의 양태에서, 본원은 네오에피토프 단독(MHC 단백질 미포함)과 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0085] 기능적 MHC 클래스 I 분자는 α 중쇄 및 β 2-마이크로글로불린 쇄를 포함한다. MHC 클래스 I 분자에 의한 펩티드 결합은 중쇄의 α 1 및 α 2 도메인에 의해 형성된 MHC 분자의 펩티드-결합 홈 내 별개 포켓과 펩티드 아미노

산 측쇄의 상호작용에 의해 달성된다. 펩티드 전반에 걸친 측쇄가 MHC 결합 능력을 촉진하거나 감소시킬 수 있지만, 전형적으로, 인간 백혈구 항원(HLA)의 경우, 주요 결합 에너지는 MHC 분자의 B 및 F 결합 포켓 및 펩티드의 C-말단 및 2번 위치의 잔기의 상호 작용으로부터 각각 유래된다(예를 들어, Guo, et al (1992) *Nature* 360:364; Silver et al (1992) *Nature* 360:367; Gorga et al (1992) *Proteins* 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 참조). 9개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드의 경우, C-말단 잔기(9번 위치)는 MHC 분자의 F 결합 포켓과 상호작용한다.

[0086] MHC 분자는 극도로 다형성이며, 클래스 I A 및 B 유전자좌에서 수천 개의 대립유전자 변이체가 확인되었다. 대부분의 다형성은 MHC 분자가 다양한 펩티드 결합 특이성을 갖도록 펩티드 결합 포켓에서 발생한다. 다형성에도 불구하고, HLA 클래스 I 분자는 공유된 펩티드 결합 특이성에 기반하여 그룹(즉, 슈퍼타입)으로 군집화(cluster)될 수 있음이 당업계에 알려져 있다. 각각의 그룹(슈퍼타입)은 "앵커 잔기" 또는 MHC 결합에 중요한 잔기인 펩티드의 위치를 반영하는 펩티드 공통 서열에 의해 정의된다. 예를 들어, A2-슈퍼타입의 HLA 클래스 I 분자(즉, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩된 단백질 또는 HLA-A2)는 2번 위치에서 작은 지방족 잔기(예를 들어, 알라닌, 티로신, 세린, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 글루타민) 및 펩티드의 C-말단에서 지방족(예를 들어, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌) 또는 작은 소수성 잔기(예를 들어, 알라닌, 발린)를 갖는 펩티드에 대해 특이적인 결합을 공유한다(예를 들어, Sidney, et al(2008) *BMC Immunology* 9:1 참조).

[0087] 특정 실시양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질, 예컨대 HLA-A2와 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 급성 골수성 백혈병(AML)-관련 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프를 포함하는 항원(예컨대 NPM1c:HLA-A2)에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0088] AML의 계통 분석은 AML 환자당 평균 13개의 코딩 돌연변이로 대부분의 다른 성인 암보다 돌연변이 하중(mutational load)이 더 낮은 것으로 나타났다(Ley et al., *N Engl J Med* 368: 2059(2013); Alexandrov et al., *NATURE* 500: 415(2013); Kandoth et al., *NATURE* 502 333(2013) 참조). 그러나, AML 내의 체세포 돌연변이는 종종 동일한 유전자(Ley et al., *N Engl J Med* 368: 2059(2013); Papaemmanuil et al., *N Engl J Med* 374: 2209(2016) 참조) 및 이러한 핫스팟 돌연변이로부터 유래된 신생항원에서 발생하고, 이에 따라 중앙-특이적 면역요법을 위한 매력적인 표적이 된다(van der Lee et al., *J CLIN INVEST* 129: 774(2019) 참조). 가장 통상적으로 발생하는 돌연변이 중에는 뉴클레오포스민(NPM1; *NPM1*에 의해 인코딩됨)을 인코딩하는 중요한 드라이버 유전자의 4-뉴클레오티드 중복(duplication)이 있으며, 이는 모든 성인 AML 환자의 30-35%에서 발생한다(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) 참조). NPM1에서 상기 돌연변이는 비정상적인 세포질 국소화를 초래하며, 돌연변이체 단백질은 NPM1c로 지칭된다. AML-관련 NPM1c 돌연변이체 단백질은 HLA-A*02:01 대립유전자 및 일부 다른 대립유전자를 가진 환자의 백혈병 아세포에서 제시되고 이에 제한되는 HLA 클래스 I인 백혈병 신생항원을 생성한다. 예를 들어, NPM1c는 가장 통상적인 HLA-A*0201 대립유전자(인간 인구의 ~50%)에 의해 제시되는 백혈병-특이적 신생항원 에피토프(AIQDLCLAV(서열번호: 1), AIQ로 약칭됨)를 생성한다(Greiner et al., *BLOOD* 120: 1282(2012) 참조).

[0089] 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질, 예컨대 HLA-A2와 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. NPM1c 네오에피토프의 길이는 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드에 대해 합당한 임의의 길이이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 5-20개의 아미노산, 6-19개의 아미노산, 7-18개의 아미노산, 8-17개의 아미노산, 8-16개의 아미노산, 8-15개의 아미노산, 8-14개의 아미노산, 8-13개의 아미노산, 8-12개의 아미노산, 9-12개의 아미노산 또는 9-11개의 아미노산이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개의 아미노산이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 12개의 아미노산이다. 일부 실시양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 11개의 아미노산이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 10개의 아미노산이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 9개의 아미노산이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프의 길이는 8개의 아미노산이다. 일부 실시양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 100개의 아미노산 잔기의 폴리펩티드 내 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5개의 연이은 아미노산의 펩티드이다.

[0090] 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 HLA-A2인 MHC 클래스 I 단백질에 결합한다. 일부 양태에서, HLA-A2에 결합하는 NPM1c 네오에피토프는, 아미노산 서열의 2번 위치가 작은 지방족 잔기(예를 들어, 알라닌, 티로신, 세린, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 글루타민)이고, 아미노산 서열의 C-말단 잔기가 지방족 잔기(예를

들어, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌) 또는 작은 소수성 잔기(예를 들어, 알라닌, 발린)인, 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, HLA-A2에 결합하는 NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열의 2번 위치가 발린, 이소류신 또는 류신이고, 아미노산 서열의 C-말단 잔기가 발린, 류신 또는 이소류신인, 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 8개의 아미노산 잔기이고, C-말단 아미노산은 8번 위치이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 9개의 아미노산 잔기이고, C-말단 아미노산은 9번 위치이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 10개의 아미노산 잔기이고, C-말단 아미노산은 10번 위치이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 11개의 아미노산 잔기이고, C-말단 아미노산은 11번 위치이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 길이가 12개의 아미노산 잔기이고, C-말단 아미노산은 12번 위치이다.

[0091] HLA-A2에 결합하는 NPM1c로부터 유래된 네오에피토프는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Greiner(2012) *Blood* 120:1282]는 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 및 AIQDLCVAV(서열번호: 71)를 포함하는 HLA-A2에 결합하는 9-mer NPM1c 네오에피토프에 대한 아미노산 서열을 동정하였다. 추가적인 예로서, 문헌 [van der Lee(2019) *J Clin Invest* 129:774]는 CLAVEEVSL(서열번호: 72)을 포함하는 HLA-A2 클래스 I 분자에 결합하는 NPM1c 네오에피토프의 아미노산 서열뿐만 아니라, VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75) 및 CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)를 포함하는 다른 HLA 일배체형에 의해 인코딩되는 MHC 클래스 I 분자에 결합하는 NPM1c 네오에피토프의 아미노산 서열을 동정하였다.

[0092] 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질의 네오에피토프(예컨대 NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 뉴클레오포스민 단백질에서 돌연변이는 뉴클레오포스민을 인코딩하는 유전자에서 4-뉴클레오티드 중복으로 인한 것이다. 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 세포질(세포질 내에 위치됨) 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프(예컨대 NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 네오에피토프는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 네오에피토프는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질의 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 네오에피토프는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질의 C-말단에서 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질은 서열번호: 56에 따른 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질은 야생형 뉴클레오포스민의 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호: 54)에 비해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 삽입, 결실, 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 서열번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 단백질로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 야생형 뉴클레오포스민의 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호: 54)에 비해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 삽입, 결실, 치환)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 서열번호: 56에 따른 아미노산 서열의 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 야생형 뉴클레오포스민의 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호: 54)에 비해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 삽입, 결실, 치환)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 단백질로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이고, 여기서 하나 이상의 돌연변이는 길이가 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기인 단백질의 영역 내에 있고, 네오에피토프는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 단백질의 영역으로부터 유래된다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 서열번호: 56에 따른 아미노산 서열을 갖는 단백질의 C-말단에서 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프는 야생형 뉴클레오포스민의 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호: 54)에 비해 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, 삽입, 결실, 치환)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 단백질로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이고, 여기서 하나 이상의 돌연변이는 C-말단 근위인 단백질의 영역(예를 들어, C-말단으로부터 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 아미노산 잔기) 내에 있고, 네오에피토프는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 단백질의 영역으로부터 유래된다. 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질(예

를 들어, HLA-A2 단백질)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 서열번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 단백질의 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0093] 일부 양태에서, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질은 C-말단 아미노산 서열 MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)를 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2 단백질)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) C-말단 아미노산 서열 MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)를 포함하는 NPM1c 단백질의 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 네오에피토프는 NPM1c 단백질의 C-말단 아미노산 서열 MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)로부터 유래된 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 펩티드이다. 일부 양태에서, 본원은 HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는 단백질 또는 HLA-A2 단백질과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) NPM1c 네오에피토프(즉, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, NPM1c는 인간 NPM1c이다.

[0094] 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는 단백질 또는 HLA-A2 단백질)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 세포질 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 네오에피토프의 아미노산 서열은 AIQDLCLAV(서열번호: 1), AIQDLCVAV(서열번호: 71), CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75) 또는 CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)를 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 HLA-A2에 의해 제시되는, AIQDLCLAV(서열번호: 1), AIQDLCVAV(서열번호: 71), CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75) 및 CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항원에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 HLA-A2에 의해 제시되는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)을 포함하는 항원에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0095] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드 및/또는 MHC 클래스 I 단백질 단독과 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않는다(예를 들어, 대조군 펩티드는 네오에피토프와 동일한 개수의 아미노산을 갖지만, 네오에피토프가 유래된 단백질과 상이한 단백질로부터 유래됨).

[0096] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 세포질 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프 단독(MHC 클래스 I 단백질, 예컨대 HLA-A2 없음)과 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않는다.

[0097] 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하고, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 AIQDLCVAV(서열번호: 71), CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75) 및 CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A2 단백질(예를 들어, HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩되는 단백질)이다.

[0098] 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)을 포함하는 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산이 치환된다. 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV를 포함하는 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV 중 임의의 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 치환된다. 일부 양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 일부 양태에서, 아미노산 치환은 AIQDLCLAV 서열(서열번호: 1) 내에 존재하는 잔기의 크기와 유사한 크기의 아미노산 잔기로 치환된다. 일부 양태에서, 아미노산 치환은 항원에 대한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 결합에 영향을 미치지 않는다 (또는 실질적으로 영향을 미치지 않음).

[0099] 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV를 포함하는 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 1 또는 2 이상의 앵커 잔기는 치환된다. (예를 들어, 서열번호: 1의 2번 위치 및/또는 9번 위치, 예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 밑줄 처리된 잔기). 일부 양태

에서, 아미노산 치환은 항원에 대한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 결합, 또는 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)에 대한 네오에피토프의 결합에 영향을 미치지 않는다(또는 실질적으로 영향을 미치지 않음). 일부 양태에서, AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 2번 위치에서 아미노산 잔기 I는 아미노산 잔기 L(류신)로 치환된다. 일부 실시양태에서, AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 2번 위치에서 아미노산 잔기 I는 아미노산 잔기 V(발린), M(메티오닌), 티로신(T), 세린(S), 글루타민(Q) 또는 A(알라닌)로 치환된다. 일부 실시양태에서, AIQDLCLAV(서열번호: 1)의 9번 위치에서 아미노산 잔기 V는 아미노산 잔기 I(이소류신), L(류신), M(메티오닌) 또는 A(알라닌)로 치환된다.

[0100]

일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV를 포함하는 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산은 치환되며, 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 표 1에서 확인되는 아미노산 서열을 포함하는 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0101]

표 1: AIQ 네오에피토프의 보존적 치환

서열 이름	서열									서열번호
AIQ 잔기	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	
AIQ 네오에피토프	A	I	Q	D	L	C	L	A	V	1
잔기 X ₁ 의 보존적 치환	<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
잔기 X ₃ 의 보존적 치환	A	I	<u>N</u>	D	L	C	L	A	V	80
잔기 X ₄ 의 보존적 치환	A	I	Q	<u>E</u>	L	C	L	A	V	81
잔기 X ₅ 의 보존적 치환	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
잔기 X ₆ 의 보존적 치환	A	I	Q	D	L	<u>S</u>	L	A	V	87
	A	I	Q	D	L	<u>A</u>	L	A	V	88
잔기 X ₇ 의 보존적 치환	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
잔기 X ₈ 의 보존적 치환	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

[0102]

[0103]

일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산이 치환되고, 항체 또는 항원 결합 단편은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)에 대해 동일한 결합 친화도를 가졌거나, 실질적으로 동일한 결합 친화도를 가졌다. 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또

는 6개의 아미노산이 치환되고, 항체 또는 항원 결합 단편은, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)과 동일하거나 이보다 더 나은 친화도로 이에 특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)에 결합하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산이 치환되고, 항체 또는 항원 결합 단편은 0.1 내지 100 nM(예를 들어, 0.1 내지 50 nM, 0.1 내지 25 nM, 10.1 내지 15 nM)의 K_D 를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)에 결합하고, 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산이 치환되고, 항체 또는 항원 결합 단편은 100 nM 미만(예를 들어, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 15 nM 미만, 7 nM 미만, 6 nM 미만, 5 nM 미만, 4 nM 미만, 3 nM 미만, 2 nM 미만, 1 nM 미만, 0.9 nM 미만, 0.8 nM 미만, 0.7 nM 미만, 0.6 nM 미만, 0.5 nM 미만, 0.4 nM 미만, 0.3 nM 미만, 0.2 nM 미만 또는 0.1 nM 미만)의 K_D 로 결합한다.

[0104] 일부 양태에서, 본원은 MHC 클래스 I 단백질, 예컨대 HLA-A2에 의해 제시되는 NPM1c 에피토프(NPM1c:HLA-A2)에 결합하고, 항-암 또는 항-종양 효과(예를 들어, 생체내 항-암 효과, 선택적으로, 여기서 암은 AML)를 갖는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0105] 일부 양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오 에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 양태에서, 네오에피토프는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A*02 대립유전자 군을 포함하는 HLA-A 대립유전자에 의해 인코딩된다. 일부 양태에서, HLA-A 대립유전자는 HLA-A*02:01이다.

[0106] 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편(예를 들어, YG1 scFv의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 서열을 가짐, 예를 들어, 서열 선택 및 실시예 참조)을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편(예를 들어, YG1 scFv의 CDR을 가짐, 예를 들어, 서열 선택 및 실시예 참조)을 제공한다. 일부 양태에서, NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 scFv이다. NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는 scFv에 대한 예시적인 아미노산 서열은 서열번호: 2에 기재된다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 2에 따른 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 scFv를 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 2에 따른 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 scFv를 제공하고, 여기서 서열번호: 2에 따른 아미노산 서열과의 동일성에서 적어도 95%의 차이가 scFv의 프레임워크 영역에 있다(또는 상보성 결정 영역(CDR)에 없음).

[0107] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 5(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)를 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH를 제공하고, 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열과의 동일성에서 적어도 95%의 차이가 VH의 프레임워크 영역에 있다(또는 상보성 결정 영역(CDR)에 없음).

[0108] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 3(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL을 제공하고, 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과의 동일성에서 적어도 95%의 차이가 VL의 프레임워크 영역에 있다(또는 상보성 결정 영역(CDR)에 없음).

임워크 영역에 있다(또는 상보성 결정 영역(CDR)에 없음).

- [0109] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 5(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 아미노산 서열 서열번호: 3(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은, 각각 서열번호: 5 및 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 및 VL를 제공하고, 서열번호: 5 및 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과의 동일성에서 적어도 95%의 차이가 VH 및 VL의 프레임워크 영역에 있다(또는 상보성 결정 영역(CDR)에 없음).
- [0110] 본원의 항체 또는 항원 결합 단편의 CDR은 카바트(Kabat), 초티아(Chothia), AbM, 컨택트(Contact) 및 IMGT를 포함하여, 당업계의 다양한 방식으로 정의된다.
- [0111] 일부 양태에서, 본원의 항체의 CDR은 서열 가변성에 기초한 카바트 시스템에 따라 정의된다(예를 들어, 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 참조). 카바트 CDR 위치는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정된다. 하나의 양태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 단편의 CDR은 카바트시스템을 사용하여 결정된다. 일부 양태에서, 본원은 카바트 시스템을 사용하여 결정된 바와 같은 YG1 scFv의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0112] 일부 양태에서, 본원의 항체의 CDR은 번역글로불린 구조적 루프 영역의 위치에 기초한 초티아 시스템에 따라 정의된다(예를 들어, 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; Tramontano A et al, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; 및 미국 특허 번호 7,709,226 참조). 용어 "초티아 CDR" 등의 용어는 당업계에서 인식되고, 문헌 [Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917]의 방법에 따라 결정된 바와 같은 항체 CDR 서열을 지칭하며, 이는 본원에서 "초티아 CDR"로 지칭된다(또한, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,709,226 및 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) 참조). 초티아 CDR 위치는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정된다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 단편의 CDR은 초티아 시스템을 사용하여 결정된다. 일부 양태에서, 본원은 초티아 시스템을 사용하여 결정된 바와 같은 YG1 scFv의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0113] 일부 양태에서, 본원의 항체의 CDR은 AbM 시스템에 따라 정의되며, 이는 카바트 CDR과 초티아 구조적 루프 사이의 절충을 나타내는 AbM 초가변 영역을 기초로 하고, 여기서 CDR은 옥스포드몰큘러(OxfordMolecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어(옥스포드 몰큘러 그룹 주식회사(Oxford Molecular Group, Inc.))를 사용하여 결정된다. AbM CDR 위치는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정된다. 하나의 양태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 단편의 CDR은 AbM 시스템을 사용하여 결정된다. 일부 양태에서, 본원은 AbM 시스템을 사용하여 결정된 바와 같은 YG1 scFv의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0114] 일부 양태에서, 본원의 항체의 CDR은 IMGT 시스템에 따라 정의된다("IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® website imgt.org, founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France 참조; 예를 들어, Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7: 132-136 and Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212 참조, 이들 모두는 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). IMGT CDR 위치는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정된다. 하나의 양태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 단편의 CDR은 IMGT 시스템을 사용하여 결정된다. 일부 양태에서, 본원은 IMGT 시스템을 사용하여 결정된 바와 같은 YG1 scFv의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0115] 일부 양태에서, 본원의 항체의 CDR은 컨택트 시스템에 따라 정의된다. 컨택트 정의는 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기초한다(bioinf.org.uk/abs)(MacCallum RM et al., (1996) J Mol Biol 5: 732-745 참조; 또한

예를 들어, 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) 참조). 컨택트 CDR 위치는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정된다. 하나의 양태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 단편의 CDR은 컨택트 시스템을 사용하여 결정된다. 일부 양태에서, 본원은 컨택트 시스템을 사용하여 결정된 바와 같은 YG1 scFv의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

- [0116] 일부 양태에서, 본원은 HLA-A2에 의해 제시된 NPM1c 에피토프에 대해 특이적으로 결합하고, 상기 시스템 중 임의의 것에 따라 정의된 바와 같은 YG1 scFv의 1, 2 또는 3개의 VH CDR 및/또는 1, 2 또는 3개의 VL CDR을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, 본원은 HLA-A2에 의해 제시된 NPM1c 에피토프에 특이적으로 결합하고, IMGT에 의해 정의된 바와 같은 YG1 scFv의 VH CDR을 1, 2 또는 3개 모두 및/또는 VL CDR을 1, 2 또는 3개 모두 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [0117] 당업계에 알려진 바와 같이, VH 및 VL은 프레임워크 영역으로 둘러싸인 CDR을 함유한다(CDR 및 FR 서열은 VH 및 VL에서 다음과 같은 서열로 나타난다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4). 선택적으로, 프레임워크 영역은 인간 프레임워크 영역이다.
- [0118] 특정 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 5(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)을 갖는 VH의 VH CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 IMGT에 의해 정의된 바와 같은 아미노산 서열 서열번호: 5를 갖는 VH의 VH CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0119] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 3(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)을 갖는 VL의 VL CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 IMGT에 의해 정의된 바와 같은 아미노산 서열 서열번호: 3(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)을 갖는 VL의 VL CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0120] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 5(YG1 scFv의 VH의 아미노산 서열)를 갖는 VH의 VH CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 아미노산 서열 서열번호: 3(YG1 scFv의 VL의 아미노산 서열)을 갖는 VL의 VL CDR을 1, 2 또는 3개 모두 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0121] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 9의 VH CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 10의 VH CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 11의 VH CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 9의 VH CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 10의 VH CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 11의 VH CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 서열번호: 9, 서열번호: 10 또는 서열번호: 11의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산은 치환되었다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 유사한 크기의 아미노산 잔기에 의한 치환이다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 항원에 대한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 결합을 개선하거나, 이에 영향을 미치지 않는다(또는 실질적으로 영향을 미치지 않음).
- [0122] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 6의 VL CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 7의 VL CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 8의 VL CDR3을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 6의 VL CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 7의 VL CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 8의 VL CDR3을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 서열번호: 6, 서열번호: 7 또는 서열번호: 8의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산은 치환되었다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 유사한 크기의 아미노산 잔기에 의한 치환이다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 항원에 대한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 결합을 개선하거나, 이에 영향을 미치지 않는다(또는 실질적으로 영향을 미치지 않음).
- [0123] 일부 양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 9의 VH CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 10의 VH CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 11의 VH CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 6의 VL

CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 7의 VL CDR2 및/또는 아미노산 서열 서열번호: 8의 VL CDR3을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 아미노산 서열 서열번호: 9의 VH CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 10의 VH CDR2 및 아미노산 서열 서열번호: 11의 VH CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 아미노산 서열 서열번호: 6의 VL CDR1, 아미노산 서열 서열번호: 7의 VL CDR2 및 아미노산 서열 서열번호: 8의 VL CDR3을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 VH 및 VL을 포함하는 항-NPM1c:HLA-A2 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 VH 및/또는 VL CDR의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산은 치환되었다.

[0124] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 단편의 VH 및/또는 VL 영역에서 하나 이상의 CDR은 NPM1c:HLA-A2에 대한 특이적 결합이 유지되는 한 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산에 의해 달라질 수 있다.

[0125] 일부 양태에서, 본원에서 제공된 항체 또는 단편은, 친화도 성숙되었고, 즉, 기재된 항체 또는 단편과 비교하여 하나 이상의 상보성 결정 영역에서 하나 이상의 변경을 가지며, 상기 하나 이상의 변경은 기재된 항체 또는 단편에 비해 항원에 대한 항체 또는 단편의 친화도의 개선으로 이어진다. 일부 양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 단편은 100 nM 미만(예를 들어, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 15 nM 미만, 7 nM 미만, 6 nM 미만, 5 nM 미만, 4 nM 미만, 3 nM 미만, 2 nM 미만, 1 nM 미만, 0.9 nM 미만, 0.8 nM 미만, 0.7 nM 미만, 0.6 nM 미만, 0.5 nM 미만, 0.4 nM 미만, 0.3 nM 미만, 0.2 nM 미만 또는 0.1 nM 미만)의 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대한 Kd를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 단편은 15 nM 미만, 10 nM 미만, 7 nM 미만, 5 nM 미만 또는 1 nM 미만(예를 들어, 0.01 내지 15 nM, 0.01 내지 10 nM, 0.01 내지 7 nM, 0.01 내지 5 nM, 0.01 내지 1 nM, 0.1 내지 15 nM, 0.1 내지 10 nM, 0.1 내지 7 nM, 0.1 내지 5 nM, 0.1 내지 1 nM, 1 내지 15 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 7 nM, 1 내지 5 nM, 5 내지 15 nM, 5 내지 10 nM 또는 5 내지 7 nM)의 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대한 Kd를 갖는다.

[0126] 일부 양태에서, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 3개의 경쇄 가변 영역 상보성 결정 영역(VL CDR 1-3) 및 3개의 중쇄 가변 영역 상보성 결정 영역(VH CDR 1-3)을 포함한다. 일부 양태에서, VH CDR1은 서열번호: 9에 따른 아미노산 서열에 대해, 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VH CDR2는 서열번호: 10에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VH CDR3은 서열번호: 11에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0127] 일부 양태에서, VL CDR1은 서열번호: 6에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서

열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VL CDR2는 서열번호: 7에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, VL CDR3은 서열번호: 8에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 80%의 서열 동일성 또는 적어도 81%의 서열 동일성 또는 적어도 82%의 서열 동일성 또는 적어도 83%의 서열 동일성 또는 적어도 84%의 서열 동일성 또는 적어도 85%의 서열 동일성 또는 적어도 86%의 서열 동일성 또는 적어도 87%의 서열 동일성 또는 적어도 88%의 서열 동일성 또는 적어도 89%의 서열 동일성 또는 적어도 90%의 서열 동일성 또는 적어도 91%의 서열 동일성 또는 적어도 92%의 서열 동일성 또는 적어도 93%의 서열 동일성 또는 적어도 94%의 서열 동일성 또는 적어도 95%의 서열 동일성 또는 적어도 96%의 서열 동일성 또는 적어도 97%의 서열 동일성 또는 적어도 98%의 서열 동일성 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0128] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단리된 항체 또는 단편이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 정제된 항체 또는 단편이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 예를 들어, (예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 전기영동(isoelectric focusing) 또는 모세관 전기영동에 의한) 전기영동 또는 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC에 의한) 크로마토그래피 방법에 의해 결정된 바와 같이, 95%, 97%, 98% 또는 99% 초과 순도로 정제된다(예를 들어, Flatman, et al., J. Chromatogr. 848:79-87(2007) 참조). 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는, 단리된 항체 또는 단편이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는, 정제된 항체 또는 단편이다. 일부 양태에서, NPM1c 네오에피토프는 본원에 기재된 임의의 NPM1c 네오에피토프이다. 일부 양태에서, NP1M1c 네오에피토프는 AIQDLCLAV(서열번호: 1)이다.

[0129] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항원(예를 들어, NPM1c:MHC 클래스 I)에 대해 적어도 10^{-7} M의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 10^{-7} M 이상, 적어도 10^{-8} M 이상, 적어도 10^{-9} M 이상, 적어도 500 nM 이상, 적어도 250 nM 이상, 적어도 100 nM 이상, 적어도 50 nM 이상, 적어도 25 nM 이상, 적어도 20 nM 이상, 적어도 15 nM 이상, 또는 적어도 10 nM 이상의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 약 25 nM 이상, 적어도 약 15 nM 이상 또는 적어도 약 10 nM 이상의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:HLA-A2 항원에 대해 결합 친화도(Kd)를 갖고, 이는 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 0.1 nM 및(또는 내지) 500 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 100 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 100 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 50 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 50 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 25 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 25 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 15 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 15 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 10 nM 사이 또는 0.5 nM 및(또는 내지) 10 nM 사이, 또는 1 nM 내지 100 nM(또는 이들 사이의 임의의 값)의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 약 0.1 nM 및(또는 내지) 약 100 nM 사이, 또는 약 0.5 nM 내지 약 100 nM의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 약 0.1 nM 및(또는 내지) 약 50 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 약 50 nM의 결합 친화도(Kd)를 갖는다.

[0130] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 $0.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 이상의 K_{on} 을 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 $1 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 이상의 K_{on} 을 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항

원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 $2.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 이상의 Kon을 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 적어도 $5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 이상의 Kon을 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $0.5 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 및(또는 내지) $50 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 사이의 Kon을 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $1 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 및(또는 내지) $10 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 사이의 Kon을 갖는다.

[0131] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $50 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 Koff를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $10 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 Koff를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $5 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 Koff를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $0.5 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 및(또는 내지) $50 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 사이의 Koff를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NPM1c:MHC 클래스 I 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 $1 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 및(또는 내지) $15 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 사이의 Koff를 갖는다.

[0132] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체는 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간화되거나 인간의 것이다. 일부 양태에서, 본원은 인간 항체 또는 인간 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 인간화 항체 또는 인간화 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 키메라 항체 또는 키메라 항체의 항원 결합 단편을 제공한다(여기서 키메라 항체는 하나의 종의 가변 영역 및 또 다른 종의 불변 영역을 갖는 항체임).

[0133] 본원에서 제공된 항체는 항원(예컨대, NPM1c:HLA-A2)에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자, 및 항체와 동일하거나 실질적으로 동일한 항원의 에피토프에 결합하는 상기 분자의 면역학적 활성 단편을 포함한다. 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 결합된 항원은 암 세포의 표면 상의 MHC 클래스 I 분자(예를 들어, HLA-A2)에 의해 제시된다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 AML 세포이다.

[0134] 일부 양태에서, 항-NPM1c:HLA-A2 항체는 본원에 기재된 바와 같은 3개의 VH CDR 및/또는 3개의 VL CDR, 인간 또는 인간-유래 프레임워크 영역, 및 인간 또는 인간-유래 불변 영역을 포함하는 인간 또는 인간화 항체 또는 면역글로불린이다. 인간 프레임워크 영역의 비-제한적인 예는 당업계, 예를 들어 문헌 [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)]에 기재된다. 하나 이상의 아미노산 치환은, 바람직하게는 NPM1c:HLA-A2에 대한 본원에 기재된 항체의 결합을 개선하기 위해서, 프레임워크 영역으로 이루어질 수 있다.

[0135] 항체가 면역글로불린인 일부 양태에서, 이용될 수 있는 항체의 종류는, 비제한적으로 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, IgY를 포함한다. 이용될 수 있는 항체의 종류는, 비제한적으로 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2를 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체 또는 IgG4 항체이다. 일부 양태에서, 항체는 야생형 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 야생형 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 돌연변이체 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 양태에서, 돌연변이체 IgG4 중쇄 불변 영역은 EU 번호지정에 따라 S228P, L235E, L235A 또는 이들의 조합 중 어느 하나를 포함한다. 일부 양태에서, 항체는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0136] 일부 양태에서, 본원은 단일쇄 항체, 예를 들어, 단일쇄 Fv(scFv)를 제공한다. 일부 양태에서, scFv는 인간 또는 인간화 scFv이다. 일부 양태에서, scFv는 링커를 포함한다. 일부 양태에서, 링커는 펩티드 링커이다. 일부 양태에서, 펩티드 링커는 Gly-Ser 링커이다. 일부 양태에서, Gly-Ser 링커는 (Gly4Ser)1(서열번호: 58),

(Gly4Ser)2(서열번호: 59), (Gly4Ser)3(서열번호: 60) 및 (Gly4Ser)4(서열번호: 61)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, Gly-Ser 링커는 아미노산 서열 SGSSGGSSSG(서열번호: 4)를 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 항체의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서 단편은, 비제한적으로 Fv 단편, Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편 또는 디설파이드-연결된 Fv(sdFv)일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본원은 Fv 단편을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본원은 Fab 단편을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본원은 F(ab') 단편을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본원은 F(ab')₂ 단편을 제공한다.

[0137] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 항체 또는 단편에 의해 표적화되는 암 세포에 대해 세포독성을 유도할 수 있고, 여기서 세포독성은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포의 식세포작용(ADCP), 보체-의존성 세포독성(CDC), 또는 상기 항체 또는 단편에 결합된 약물 또는 독소의 세포 독성으로 인한 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 ADCC, ADCP 및 CDC를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 ADCC 및 ADCP를 갖는다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 오직 ADCC 또는 오직 CDC 활성을 갖는다.

[0138] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체-의존성 세포의 식세포작용(ADCP)을 매개한다. ADCC 및/또는 ADCP 기능을 갖는 항체를 제조하는 방법이 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 항체의 Fc 영역은, ADCC를 초래하는 호중구, 대식세포, NK 세포, 호산구 및 비만 세포 및 ADCP를 초래하는 대식세포, 호중구 및 수지상 세포 상의 Fc 수용체에 대한 이의 결합을 매개한다. 일부 양태에서, 본원은 ADCC 활성을 갖는 항체를 제공하고, 여기서 항체의 Fc 영역은 인간 IgG 또는 IgE 형이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG1 동종형의 것이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG2 동종형의 것이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG3 동종형의 것이다. 항체는 이의 ADCC 및/또는 ADCP 활성을 증가시키기 위해 (예를 들어, 돌연변이, 교차연결, 디-설파이드 결합 형성 또는 올리고사카라이드 첨가에 의해) 생체조작될 수 있다(예를 들어, Natsume et al., 2009, Drug Des Devel Ther. 3:7-16 참조, 이는 본원에 참조로 포함됨). 하나의 실시양태에서, 항체의 Fc 영역의 CH2 및/또는 CH3 도메인은 ADCC 및/또는 ADCP 활성을 개선하기 위해서 푸코스 잔기를 감소 또는 제거하도록 이들의 글리코실화 부위에서 변형된다(예를 들어, Liu et al., 2015, Ca Immunol. Res. 3:173-183; Satoh et al., 2006, Expert Opin Biol. Ther. 6:1161-1173 참조; 이들 모두 본원에 참조로 포함됨). 하나의 실시양태에서, 인간 IgG1 동종형의 Fc 영역은 CH2 도메인의 333번 위치에서 알려진 치환으로 돌연변이화 된다. 하나의 실시양태에서, 인간 IgG1 동종형의 Fc 영역은 다음과 같은 잔기: S239D, I332E 및 A330L에서 돌연변이화 된다(예를 들어, Lazar et al., 2006, PNAS 103:4005-4010 참조, 이는 본원에 참조로 포함됨). 하나의 실시양태에서, 인간 IgG1 동종형의 Fc 영역은 다음과 같은 잔기: S239D, I332E 및 G236A에서 돌연변이화 된다(예를 들어, Richards et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7:2517-27 참조). 하나의 실시양태에서, Fc 영역은 ADCC 활성을 개선시키는 298, 333 및/또는 334(EU 번호지정)번 위치(들)에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0139] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 보체-의존성 세포독성(CDC)을 매개한다. CDC 기능을 갖는 항체를 제조하는 방법이 당업계에 알려져 있다. 일부 양태에서, 본원은 CDC 활성을 갖는 항체를 제공하고, 여기서 항체의 Fc 영역은 인간 IgG 또는 IgM 형이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG1 동종형의 것이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG2 동종형의 것이다. 하나의 실시양태에서, 고려되는 항체의 Fc 영역은 IgG3 동종형의 것이다. 항체는 이의 CDC 활성을 증가시키기 위해 생체조작(예를 들어, 돌연변이화)될 수 있다(예를 들어, 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 참조; 이들 모두 본원에 참조로 포함됨). 하나의 실시양태에서, IgG Fc를 갖는 항체는, 이의 글리코실화 부위의 N-글리칸 구조를 푸코스 및 시알산 잔기 없이 N-아세틸글루코사민에서 종결되는 G0 글리칸 유형으로 변경하기 위해, 이의 Fc 영역에서 생체조작된다. 하나의 실시양태에서, Fc 영역은, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642 또는 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184(2000)]에 기재된 바와 같이 변형되어 CDC 활성을 개선하였다.

[0140] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 세포독성제(예를 들어, 독소 또는 약물)에 결합된다. 세포독성제는 세포 죽음을 유도하거나 필수적인 세포 기능을 억제하는 작용제일 수 있다. 세포독성제는, 비제한적으로 화학요법제, 성장 억제제, 방사성 동위원소 또는 독소일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 독소(예를 들어, 디프테리아 A 쇄, 외독소 A 쇄, 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 디안틴 단백질, 모모르디카 카란티아 억제제, 크로틴, 젤로닌,

네오마이신, 트리코테센, 페노마이신, 미토겔린, 리스트릭토신, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 커신, 파이톨라카 아메리카나 단백질, 알류라이트 포르디 단백질 또는 알파-사르신)에 결합(예를 들어, 접합)된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 방사성 동위원소(예를 들어, P^{32} , I^{131} , I^{125} , At^{211} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} 또는 Pb^{212})에 결합(예를 들어, 접합)된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 약물(예를 들어, 항-대사물질 약물, 항-염산 약물, 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신), 메토타렉세이트, 타산(예를 들어, 도세탁셀), 파클리탁셀, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신)에 결합(예를 들어, 접합)된다. 항체-약물 접합체를 제조하는 방법이 당업계에 알려져 있다(상기 접합체에 사용될 수 있는 약물 및 항체를 약물에 연결하기 위해 사용될 수 있는 링커 포함)(예를 들어, Peters & Brown, 2015, Biosci. Rep. 35, e00225, doi:10.1042/BSR20150089 참조).

[0141] 또한, 동일한 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편, 및/또는 인간 NMP1c:HLA-A2에 대한 결합을 본원에 기재된 임의의 항체 및 단편(예를 들어, 각각 서열번호: 5 및 3에 따른 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편)과 경쟁하는 항체 또는 이의 단편이 본원에 포함된다. 동일한 에피토프를 인식하거나 결합에 대해 경쟁하는 항체 및 이의 단편은 일상적인 기술을 이용하여 동정될 수 있다. 상기 기술은, 예를 들어 하나의 항체가 표적 항원에 대한 또 다른 항체의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 면역검정, 즉 경쟁적 결합 검정을 포함한다. 경쟁적 결합은 테스트 중인 항체가 NMP1c:HLA-A2와 같은 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 검정에서 결정된다. 수많은 종류의 경쟁적 결합 검정, 예를 들어 고체상 직접 또는 간접 방사선면역검정(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역검정(EIA), 샌드위치 경쟁 검정(Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242(1983) 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614(1986) 참조); 고체상 직접 표지된 검정, 고체상 직접 표지된 샌드위치 검정(Harlow and Lane, *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1988) 참조); I-125 표지를 이용하는 고체상 직접 표지 RIA(Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7(1988) 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(Cheung *et al.*, *Virology* 176:546(1990)); 및 직접 표지된 RIA(Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77(1990))가 알려져 있다. 전형적으로, 이러한 검정은, 비표지된 테스트 항체와 표지된 기준 항체(예를 들어, 각각 서열번호: 5 및 3에 따른 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함하는 항체) 중 하나를 갖는 세포 또는 고체 표면에 결합된 정제된 항원(예를 들어, NMP1c:HLA-A2)의 사용을 포함한다. 경쟁적 억제는 테스트 항체의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다. 일반적으로 테스트 항체가 과도하게 존재한다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과도하게 존재할 경우에, 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 또는 그 초과로 억제할 것이다. 다른 기술은, 예를 들어 에피토프의 원자 분해능(atomic resolution)을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 x-선 분석과 같은, 에피토프 맵핑 방법을 포함한다. 다른 방법은 항원 단편 또는 돌연변이화된 항원의 변이에 대한 항체의 결합을 모니터링하고, 여기서 항원 서열 내의 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합 손실이 종종 에피토프 구성요소의 지표로 간주된다. 또한, 에피토프 맵핑을 위한 컴퓨터 조합 방법도 사용될 수 있다. 이러한 방법은 조합 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리로부터 특정한 짧은 펩티드를 친화도 단리하는 관심 항체의 능력에 의존한다. 그 후, 펩티드는 펩티드 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용되는 항체에 대응하는 에피토프 정의를 위한 리드(lead)로 간주된다. 또한, 에피토프 맵핑을 위해, 형태학적 불연속 에피토프를 맵핑하는 것으로 밝혀진 컴퓨터 알고리즘이 개발되었다.

[0142] 네오에피토프를 동정하는 방법

[0143] 일부 실시양태에서, 본원은 MHC 분자와 복합체 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 실시양태에서, 네오에피토프는 종양- 또는 암-특이적 네오에피토프이다. 일부 실시양태에서, MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자이다.

[0144] 네오에피토프가 유래된 종양- 또는 암-특이적 항원은 비-침묵 체세포 돌연변이로 인한 변경된 아미노산 서열을 함유한다. 예를 들어, 돌연변이-유래 네오에피토프는, 점 돌연변이(예를 들어, 단백질에서 다른 아미노산을 초래하는 비동의적(nonsynonymous) 돌연변이); 정지 코돈이 변형되거나 결실되어 C-말단에서 신규 종양 특이적-서열을 갖는 더 긴 단백질의 번역을 초래하는 리드-스루 돌연변이(read-through mutation); 성숙한 mRNA에 인트론을 포함시켜 고유한 종양-특이적 단백질 서열을 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이; 2개 단백질의 접합부에서 종양-특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 야기하는 염색체 재배열(즉, 유전자 융합); 신규 종양-특이적 단백질 서열을 갖는 새로운 오픈 리딩 프레임 초래하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실; 및 전좌로부터 발생한다.

[0145] 종양- 또는 암-특이적 돌연변이로 인한 종양 네오에피토프의 동정 방법이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Richters, et al.(2019) *Genome Medicine* 11:56; Liu, et al.(2017) *Cell* 168:600 참조). 상기 방법은 일반적인

로 종양-특이적 돌연변이의 동정(예를 들어, 심층 핵산 또는 단백질 서열분석 기술 사용), 환자 인간 백혈구 항원 종류의 동정 및 종양에 존재하는 해당 주요 조직적합성 복합체의 예측, 네오에피토프의 동정(예를 들어, 환자 HLA 대립유전자에 결합할 수 있고 종양에 존재하는 돌연변이에 기반한 후보 T 세포 에피토프 세트를 생성하기 위한 분석 기술 또는 검증된 펩티드-MHC 결합 예측 알고리즘의 어플리케이션 사용), 선택된 네오에피토프에 대한 항원-특이적 T 세포의 선택적 입증 또는 후보 네오에피토프가 종양 표면 상의 HLA 단백질에 결합되는 것의 입증을 포함한다.

[0146] 심층 핵산 기술이 당업계에 알려져 있다. 임의의 적합한 서열 분석 방법이 이용된다. 상기 방법은, 예를 들어 연쇄-종결 서열분석 방법에 기초한 통상적인 생어 서열분석(Sanger sequencing)을 사용하는 서열 분석을 포함한다(예를 들어, Sanger, et al(1977) *PNAS* 74:5463 참조). 추가적인 예로서, 서열 분석 방법은 차세대 서열분석(NGS)의 사용을 포함한다. NGS 방법은 당업계에 알려져 있으며, 파이로서열분석(pyrosequencing), 합성에 의한 일루미나(Illumina) HiSeq 및 MiSeq 서열분석, 지원되는 올리고뉴클레오타이드 결합 및 검출(솔리드(SOLiD)), DNA 나노볼 서열분석, 이온 토렌트(Ion Torrent) 서열분석, 단일-분자 실시간(SMRT) 서열분석, 헬리코스(Helicos) 서열분석 및 나노포어(Nanopore) 서열분석에 기초한 서열분석 기술을 포함한다.

[0147] 핵산 서열분석은 전체 종양 게놈, 종양 엑솜(단백질-인코딩 DNA), 게놈의 표적 부분(예를 들어, HLA 유전자 좌) 또는 종양 전사체에서 수행된다. 일부 양태에서, 서열분석의 결과는 알려진 대조군 세트 또는 환자의 정상 조직 또는 일치하는 정상 조직에 대해 수행된 서열분석에 따른 분석과 비교된다. 하나 이상의 알고리즘을 사용하여 서열분석 데이터에 존재하는 상이한 종류의 체세포 돌연변이를 동정한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 알고리즘을 사용하여 단일 뉴클레오타이드 변이체로부터 발생한 변이를 검출(예를 들어, Cornish, et al(2015) *Biomed Res Int* 2015:456479; Ghoneim, et al(2014) *BMC Res Notes* 7:864; Krøigard, et al(2016) *PLoS One* 11:e0151664 참조)하고/하거나 삽입-결실(indel)로부터 발생한 변이를 검출(예를 들어, Mose, et al(2014) 30:2813-2815; Narzisi, et al(2014) *Nat Methods* 11:1033-1036 참조)한다. 추가로, 일부 실시양태에서, 2개의 단백질-코딩 서열의 융합의 검출은 RNA 서열분석 데이터 및/또는 전체 게놈 서열분석 데이터의 분석에 의해 수행된다(예를 들어, 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 참조). 일단 종양 DNA 또는 RNA에서 변이체가 검출되면, 번역된 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대한 각각의 변이체의 영향은 당업계에 알려진 컴퓨터 도구를 사용하여 결정된다. 추가적으로, 번역된 폴리펩티드의 절단 부위의 예측 및 MHC 클래스 I 항원 처리로부터 유래된 펩티드의 동정을 돕는 여러 도구가 이용가능하다. 상기 도구의 비-제한적인 예는 넷썬20S(NetChop20S), 넷썬C텀(NetChopCterm) 및 프로테아SMM(ProteaSMM)을 포함한다(예를 들어, Nielsen, et al(2005) *Immunogenetics* 57:33; Tenzer, et al(2005) *Cell Mol Life Sci* 62:1025 참조).

[0148] 또한, 단백질 서열분석 방법이 당업계에 알려져 있다. 일부 양태에서, 트로테인(trotein) 서열분석은 종양 단백질에 대해 수행된다. 일부 양태에서, 단백질 질량 분석을 이용하여 종양 세포 상의 MHC 단백질에 결합된 돌연변이화된 펩티드의 존재를 동정하거나 검증한다. 펩티드는 종양으로부터 면역침강된 HLA 분자 또는 종양 세포로부터 산-용리된 후 질량 분석을 이용하여 동정된다.

[0149] 일부 양태에서, 일단 변이체 종양-특이적 펩티드가 동정되면, MHC 클래스 I 또는 II 분자에 대한 이들의 결합 예측은 환자의 HLA 일배체형에 대한 지식을 요구한다. 인간 내 MHC는 염색체 6p21.3에 위치한 HLA 유전자 복합체에 의해 인코딩된다. 이 유전자좌는 12,000개 초과로 확립된 대립유전자를 갖는, 고도로 다형성이다. HLA 유전자가 개별화되기 때문에, 정확한 HLA 일배체형화가 요구된다. HLA 일배체형화 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, HLA 일배체형화는 생어 서열분석- 또는 NGS-기반 방법을 사용하는 서열분석 및 서열 특이적 PCR 증폭을 사용하여 수행된다. 서열분석 데이터에 기초한 HLA 클래스 I 및 II 일배체형의 동정을 위한 복수의 알고리즘, 예를 들어 폴리솔베르(Polysolver)(Shukla, et al(2015) *Nat Biotech* 33:1152), HLA마이너(HLAMiner)(Warren, et al(2012) *Genome Med* 4:95) 및 옵티타입(OptiType)(Szolek, et al(2014) *Bioinformatics* 30:3310)이 이용가능하다.

[0150] 일부 양태에서, 컴퓨터 알고리즘을 사용하여, 추정 네오에피토프, 즉 펩티드 서열을 예측하고, 이는 펩티드-제시 복합체의 형태로 클래스 I 또는 클래스 II의 MHC 분자에 의해 결합되고, 그 후, 이러한 형태로, T-림프구의 T-세포 수용체에 의해 인식된다. MHC 클래스 I에 결합하는 펩티드를 동정하는 데 유용한 프로그램의 비-제한적인 예는, SMM(Nielsen, et al(2007) *BMC Bioinformatics* 8:238), SMMPMBEC(Kim et al(2009) *BMC Bioinformatics* 10:394), 픽포켓(Pickpocket)(Zhang, et al 2009) *Bioinformatics* 25:1293), 넷MHC(NetMHC)(Andreatta, et al 2016) *Bioinformatics* 32:511), 넷MHC판(NetMHCpan)(Jurtz et al(2017) *J Immunol* 199:3360), 넷MHC콘스(NetMHCcons)(Karosiene, et al(2012) *Immunogenetics* 64:177), MHC플러리

(MHCflurry)(O'Donnell, et al(2018) *Cell Syst* 7:129) 및 EDGE(Bulik-Sullivan et al(2018) *Nat Biotech*)를 포함한다.

[0151] 일부 양태에서, 일단 추정 네오에피토프가 선택되면, 이들은 시험관내 및/또는 생체내 검정을 이용하여 추가로 테스트된다. 일부 양태에서, 선택된 펩티드는 상이한 HLA 일배체형에 의해 인코딩되는 MHC 분자에 대한 결합을 결정하기 위해 인간 HLA 패널에서 합성되고 스크리닝된다.

[0152] **항체를 제조하는 방법**

[0153] 본원에 기재된 항체 및 단편은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0154] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 예를 들어, 파지 디스플레이기술, 박테리아 디스플레이, 효모 표면 디스플레이, 진핵생물 바이러스 디스플레이, 포유류 세포 디스플레이 및 무세포(예를 들어, 리보솜 디스플레이) 항체 스크리닝 기술을 포함할 수 있다(예를 들어, 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; 및 Hanes et al. (2000) *Nat Biotechnol* 18:1287-1292 참조).

[0155] 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 항체를 동정하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 상기 파지를 활용하여, 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 무인)로부터 발현되는, Fab, Fv 또는 디설파이드-결합 안정화된 Fv 항체 단편과 같은 항체의 항원 결합 도메인을 디스플레이할 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 파지는, 전형적으로 fd 및 M13과 같은 필라멘트상 파지이다. 항원 결합 도메인은 임의의 파지 코트 단백질 pIII, pVIII 또는 pIX에 재조합적으로 융합된 단백질로서 발현된다. 예를 들어, 문헌 [Shi et al.(2010) *JMB* 397:385-396]를 참조하라. 본원에 기재된, 면역글로불린 또는 이의 단편을 제조하기 위해 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는, 문헌 [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]; 및 PCT 공개 번호 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 및 WO 95/20401에 개시된 것들을 포함한다. 또한, 적합한 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108에 기재되어 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, 파지 디스플레이 항체 라이브러리는 면역화된 포유동물 유래의 B 세포로부터 수집된 mRNA를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, B 세포를 포함하는 비장 세포 샘플은 상기한 바와 같이 NPM1c:HLA-A2 복합체로 면역화된 마우스로부터 단리될 수 있다. mRNA는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 세포로부터 단리되고 cDNA로 전환될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Sambrook et al.(1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]; *앞선* [Harlow and Lane(1988)]; *앞선* [Benny K. C. Lo(2004)]; 및 *앞선* [Borrebaek(1995)]를 참조하라. 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 가변 영역에 대해 코딩하는 cDNA를 사용하여 파지 디스플레이 라이브러리를 구성한다. 이러한 라이브러리를 생성하기 위한 방법은, 예를 들어 문헌 [Merz et al.(1995) *J Neurosci Methods* 62(1-2):213-9]; [Di Niro et al.(2005) *Biochem J* 388(Pt 3):889-894]; 및 [Engberg et al.(1995) *Methods Mol Biol* 51:355-376]에 기재되어 있다.

[0157] 효모 표면 디스플레이 방법을 사용하여 항체를 동정하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 본원에 기재된 항체 및 단편을 제조하기 위해 사용될 수 있는 효모 표면 디스플레이 방법의 예는 문헌 [Chao et al., 2006, *Nature Protocols* 1(2):755-768]에 기재된 방법을 포함한다.

[0158] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체를 제조하기 위한 방법은 적절한 면역원으로 대상체(예를 들어, 비-인간 포유동물)를 면역화하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항체를 생성하기에 적합한 면역원이 본원에 제시된다. 예를 들어, NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체를 생성하기 위해, 당업자는 적합한 대상체(예를 들어, 비인간 포유동물, 예컨대 래트, 마우스, 저빌, 햄스터, 개, 고양이, 돼지, 염소, 라마, 말 또는 비-인간

영장류)를, 예를 들어 NPM1c 네오에피토프가 AIQDLCLAV(서열번호: 1)인 경우에 NPM1c:HLA-A2 복합체를 포함하는 항원으로 면역화할 수 있다. 적합한 대상체(예를 들어, 비-인간 포유동물)는 포유동물에 의한 항체의 제조를 유도하기에 충분한 수회의 후속 면역화 부스팅(booster immunization)과 함께 적절한 항원으로 면역화될 수 있다. 면역원은 보조제와 함께 대상체(예를 들어, 비-인간 포유동물)에 투여될 수 있다.

[0159] 하이브리도마 기술을 사용하여 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 면역원에 결합하는 단클론성 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 제조하는 것을 포함한다. 예를 들어, 실험실 마우스와 같은 적합한 포유동물은 상기한 바와 같이 NPM1c:HLA-A2 복합체로 면역화된다. 면역화된 포유동물의 항체-생산 세포(예를 들어, 비장의 B 세포)는 면역원의 적어도 1회의 면역화 부스팅 2 내지 4일 후에 단리될 수 있고, 그 후 적합한 골수종 세포주의 세포와 융합하기 전에 배양물에서 잠시 성장할 수 있다. 세포는, 예를 들어 종두증 바이러스 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합 프로모터의 존재 하에 융합될 수 있다. 융합에서 수득된 하이브리드 세포는 클로닝되고, 원하는 항체를 분비하는 세포 클론이 선택된다. 예를 들어, 적합한 면역원으로 면역화된 Balb/c 마우스의 비장 세포는 골수종 세포주 PAI 또는 골수종 세포주 Sp2/0-Ag 14의 세포와 융합될 수 있다. 융합 후 세포는, 정상 골수종 세포가 원하는 하이브리도마 세포를 과성장시키는 것을 방지하기 위해서 일정 간격으로 선택 배지, 예를 들어 HAT 배지로 보충된, 적합한 배양 배지에서 확장된다. 그 후, 수득된 하이브리드 세포는 원하는 항체(예를 들어, NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체)의 분비에 대해 스크리닝된다.

[0160] 일부 실시양태에서, 당업자는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,300,064(Knappik et al.; 몰포시스 아게(Morphosys AG)) 및 문헌 [Schoonbroodt et al.(2005) *Nucleic Acids Res* 33(9):e81]에 기재된 바와 같이, 비-인간계 라이브리로부터 관심 항체를 동정할 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 선택 및 스크리닝의 조합을 사용하여, 예를 들어 하이브리도마-유래 항체의 집단 또는 파지 디스플레이 항체 라이브러리로부터 관심 항체를 동정할 수 있다. 적합한 방법이 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, *앞선* [Hoogenboom(1997) *Trends in Biotechnology* 15:62-70; Brinkman et al.(1995)]; *앞선* [Ames et al.(1995)]; *앞선* [Kettleborough et al.(1994), *supra*; Persic et al.(1997)]; 및 *앞선* [Burton et al.(1994)]에 기재되어 있다. 예를 들어, 박테리오파지 코트 단백질(예를 들어, M13 파지의 pIII, pVIII 또는 pIX)의 융합 단백질 및 상이한 항원-조합 영역을 각각 인코딩하는, 복수의 파지미드 벡터가 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 제조되고, 그 후 박테리아(예를 들어, *대장균(E. coli)*)의 집단에 도입될 수 있다. 박테리아에서 박테리오파지의 발현은, 일부 실시양태에서, 헬퍼 파지의 사용을 필요로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 헬퍼 파지가 필요하지 않다(예를 들어, Chasteen et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34(21):e145 참조). 박테리아로부터 제조된 파지가 회수된 후, 예를 들어 고체 지지체에 결합된 표적 항원(고정됨)에 접촉된다. 파지는 또한 용액 내 항원에 접촉될 수 있고, 복합체는 후속적으로 고체 지지체에 결합된다.

[0162] 상기 방법을 사용하여 스크리닝된 항체의 아집단은 당업계에 알려진 임의의 면역학적 또는 생화학적 기반 방법을 사용하여 특정 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대한 이들의 특이성 및 결합 친화도에 대해 특징화될 수 있다. 예를 들어, NPM1c:HLA-A2에 대한 항체의 특이적 결합은, 예를 들어 면역학적 또는 생화학적 기반 방법, 예컨대 비제한적으로 상기한 바와 같은 ELISA 검정, SPR 검정, 면역침강 검정, 친화도 크로마토그래피 및 평형 투석을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 면역특이적 결합 및 교차-반응성을 분석하기 위해 사용될 수 있는 면역 검정은, 비제한적으로 웨스턴 블롯, RIA, ELISA(효소 연결 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침강 검정, 면역확산 검정, 응집 검정, 보체-결합 검정, 면역방사계측 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 사용하는 경쟁 및 비경쟁 검정 시스템을 포함한다. 상기 검정은 일상적이며 당업계에 잘 알려져 있다.

[0163] 키메라 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Morrison, 1985, *Science* 229:1202-7; Oi and Morrison, 1986, *BioTechniques* 4:214-221; Gillies et al., 1989, *J Immunol. Methods* 125:191-202; 및 미국 특허 번호 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397 및 6,331,415 참조).

[0164] 인간화 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, WO 91/09967; 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; WO 93/17105; 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 참조). 예를 들어, 인간화 항체는 CDR 그래프팅에 의해 제조될 수 있다.

[0165] 인간 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 인간 항체는 상기 기재된 바와 같이, 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 파지 디스플레이 또는 효모 표면 디스플레이 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 미국 특허 번호 4,444,887, 4,716, 111 및 5,885,793; 및 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741을 참조하라. 인간 항체는 또한 마우스-인간 하이브리도마를 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, Shinmoto et al, 2004, Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa et al, 2005, Human Antibodies 14: 27-31 참조).

[0166] 항체 단편을 제조하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은, (F(ab')₂ 단편을 생성하기 위한) 펩신 또는 (Fab 단편을 생성하기 위한) 파파인과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해효소(proteolytic) 절단에 의해 제조될 수 있다. 또한, scFv 단편을 제조하는 방법이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 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 참조). 원하는 항원-결합 특성을 갖는 scFv는 파지 디스플레이 기술 또는 효모 표면 디스플레이 기술에 의해 선택될 수 있다. scFv는 (제조할 발현 기술 사용하여) 짧은 폴리펩티드 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 융합함으로써 구성될 수 있다. 단일 도메인 항체(예를 들어, 경쇄가 없는 항체)를 제조하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 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 참조).

[0167] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Konterman, 2012, MAbs 4: 182-197; Gramer et al., 2013, MAbs 5:962-973 참조).

[0168] 선택된 CDR 아미노산 서열이 짧은 서열(예를 들어, 길이가 10-15개 미만의 아미노산)인 실시양태에서, CDR을 인코딩하는 핵산은, 예를 들어 문헌 [Shiraishi et al.(2007) *Nucleic Acids Symposium Series* 51(1):129-130] 및 미국 특허 번호 6,995,259에 기재된 바와 같이 화학적으로 합성될 수 있다. 수용체 항체를 인코딩하는 주어진 핵산 서열의 경우, CDR을 인코딩하는 핵산 서열의 영역은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 화학적으로 합성된 핵산으로 대체될 수 있다. 화학적으로 합성된 핵산의 5' 및 3' 말단은 공여자 항체의 가변 영역을 인코딩하는 핵산 내로 핵산을 클로닝하는 데 사용하기 위한 점착성 말단 제한 효소 부위를 포함하도록 합성될 수 있다.

[0169] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 상응하는 미변경된 불변 영역에 비해 향상되거나 감소된(또는 부재함) 이펙터 기능을 갖는 변경된 중쇄 불변 영역을 포함한다. 본원에 기재된 항체의 불변 영역을 포함하는 이펙터 기능은 불변 또는 Fc 영역의 특성을 변경함으로써 조절될 수 있다. 변경된 이펙터 기능은, 예를 들어 다음과 같은 활성 중 하나 이상의 조절을 포함한다: 항체-의존성 세포상 세포독성(ADCC), 보체-의존성 세포독성(CDC), 세포사멸(apoptosis), 하나 이상의 Fc-수용체에 대한 결합, 및 전염증성 반응. 조절은 불변 영역의 미변경된 형태의 활성과 비교하여, 변경된 불변 영역을 함유하는 대상체 항체에 의해 나타나는 이펙터 기능 활성의 증가, 감소 또는 제거를 지칭한다. 변경된 FcR 결합 친화도 및/또는 ADCC 활성 및/또는 변경된 CDC 활성을 갖는 변경된 불변 영역은, 불변 영역의 미변경된 형태와 비교하여 향상 또는 약화된 FcR 결합 활성 및/또는 ADCC 활성 및/또는 CDC 활성을 갖는 폴리펩티드이다. FcR에 대한 증가된 결합을 디스플레이하는 변경된 불변 영역은 미변경된 폴리펩티드보다 더 큰 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다. FcR에 대한 감소된 결합을 디스플레이하는 변경된 불변 영역은 불변 영역의 미변경된 형태보다 더 낮은 친화도로 적어도 하나의 FcR에 결합한다.

[0170] 항체에 CDC 또는 ADCC 활성을 부여하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Kellner et al., 2014, Methods 65: 105-113; WO 2012010562; Natsume et al., 2009, Drug Design, Development and Therapy 3(3):7-16 참조). 이러한 방법은, 비제한적으로 Fc 동종형 서플링, 향상된 CDC 및/또는 ADCC 활성을 부여하는 Fc 영역 내의 아미노산 돌연변이, 및 향상된 CDC 및/또는 ADCC 활성을 부여하는 Fc 영역 글리코실화 프로파일의 변화를 포함한다.

[0171] 예를 들어, 본원에 기재된 항체는 향상되거나 감소된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 나타내는 변경된 불변 영역을 함유할 수 있다. 조절된 CDC 활성은 항체의 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 도입함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,194,551을 참조하라. 대안적으로 또는 추가적으로, 시스테인 잔기(들)는 Fc 영역 내에 도입되어, 이 영역에서 쇠간 디설파이드 결합 형성을 가능하게 할 수 있다.

이렇게 생성된 동종이량체성 항체는 개선되거나 감소된 내부화(internalization) 능력 및/또는 증가되거나 감소된 보체-매개 세포 사멸을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Caron et al. (1992) *J Exp Med* 176:1191-1195 and Shopes (1992) *Immunol* 148:2918-2922]; PCT 공개 번호 WO 99/51642 및 WO 94/29351; 문헌 [Duncan and Winter (1988) *Nature* 322:738-40]; 및 미국 특허 번호 5,648,260 및 5,624,821을 참조하라.

[0172] 본원에 기재된 임의의 항체는, 당업계에서 알려진 임의의 면역학적 또는 생화학적-기반 방법을 사용하여, *시험관 내* 또는 *생체내*에서, 항원, 예를 들어 NPM1c:HLA-A2에 기인한 임의의 활성 또는 기능을 조절하는 이의 능력에 대해 스크리닝되고/되거나 테스트될 수 있다.

[0173] 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 분자 생물학 및 단백질 화학 분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 중 하나 또는 둘 모두를 인코딩하는 핵산은, 예를 들어 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 정지 서열, 번역 시작 및 정지 서열, 전사 종결자 신호, 폴리아데닐화 신호, 및 증폭자(enhancer) 또는 활성자 서열을 포함하는, 전사 및 번역 조절 서열을 함유하는 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 조절 서열은 프로모터 및 전사 시작 및 정지 서열을 포함한다. 또한, 발현 벡터는 2가지 상이한 유기체, 예를 들어 발현을 위한 포유류 또는 곤충 세포, 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지될 수 있도록 하나 이상의 복제 시스템을 포함할 수 있다.

[0174] 포유류 세포 내 핵산으로부터 클로닝된 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 발현을 위해 여러 가능한 벡터 시스템이 이용가능하다. 벡터의 하나의 클래스는 숙주 세포 계통 내로 원하는 유전자 서열을 통합하는 것에 의존한다. 안정적으로 통합된 DNA를 갖는 세포는, *대장균* gpt(Mulligan and Berg(1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072) 또는 *Tn5* 네오(Southern and Berg(1982) *Mol Appl Genet* 1:327)와 같은 약물 저항성 유전자를 동시에 도입함으로써 선택될 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 유전자 서열에 연결되거나, 공동-형질감염에 의해 동일한 세포에 도입될 수 있다(Wigler et al.(1979) *Cell* 16:77). 벡터의 두 번째 클래스는 염색체의 플라스미드로 자체적으로 복제하는 능력을 부여하는 DNA 요소를 활용한다. 이들 벡터는 동물 바이러스, 예컨대 소 유두종 바이러스(Sarver et al.(1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7147), 거대세포바이러스, 폴리오마 바이러스(Deans et al.(1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1292) 또는 SV40 바이러스(Lusky and Botchan(1981) *Nature* 293:79)로부터 유래될 수 있다.

[0175] 발현 벡터는 핵산의 후속 발현에 적합한 방식으로 세포에 도입될 수 있다. 도입 방법은 대체로 이하에 논의되는, 표적 세포 종류에 의해 결정된다. 예시적인 방법은 CaPO₄ 침전, 리포솜 융합, 양이온성 리포솜, 전기천공, 바이러스 감염, 텍스트란-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, 원형질체 융합 및 직접 미세주입을 포함한다.

[0176] 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 효모, 박테리아, 곤충, 식물 및 포유류 세포를 포함한다. 특히 관심대상은 박테리아, 예컨대 *대장균*, 진균, 예컨대 *사카로미세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 *피키아 파스토리스*(*Pichia pastoris*), 곤충 세포, 예컨대 SF9, 및 포유류 세포주(예를 들어, 인간 세포주)뿐만 아니라 단일 세포주(primary cell line)이다.

[0177] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 유전자이식 동물(예를 들어, 유전자이식 포유동물)에서 발현되고 이로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 항체는 예를 들어, 문헌 [Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629]; [van Kuik- Romeijn et al. (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159]; 및 [Pollock et al. (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2):147-157]에 기재된 바와 같이, 유전자이식 비-인간 포유동물(예를 들어, 설치류)에서 제조될 수 있고, 모유로부터 단리될 수 있다.

[0178] 항체 및 이의 단편은, 단백질의 발현을 가능케 하기에 충분한 조건과 시간 동안 항체 또는 단편을 인코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 세포로부터 제조될 수 있다. 단백질 발현을 위한 이러한 조건은 발현 벡터 및 숙주 세포의 선택에 따라 달라질 것이며, 일상적인 실험을 통해 당업자에 의해 용이하게 확인될 것이다. 예를 들어, *대장균*에서 발현된 항체는 봉입체로부터 리폴딩될 수 있다(예를 들어, Hou et al. (1998) *Cytokine* 10:319-30 참조). 박테리아 발현 시스템 및 이의 사용 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, and Molecular Cloning--A Laboratory Manual --3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001) 참조). 코돈, 적합한 발현 벡터 및 적합한 숙주 세포의 선택은 다수의 요인에 따라 달라질 것이며, 필요에 따라 쉽게 최적화될 수 있다. 본원에 기재된 항체(또는 이의 단편)는 포유류 세포에서 발현될 수 있거나, 비제한적으로 효모, 배플로바이러스 및 *시험관내* 발현 시스템을 포함하는 다른 발현 시스템에서 발현될 수 있다(예를 들어, Kaszubska et al. (2000) *Protein*

Expression and Purification 18:213-220 참조).

- [0179] 발현 후, 항체 및 이의 단편은 분리될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 다른 어떤 구성요소가 샘플에 존재하는지에 따라 당업자에게 알려진 다양한 방식으로 분리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제 방법은, 이온 교환, 소수성, 친화도 및 역상 HPLC 크로마토그래피를 포함하여, 전기영동, 분자, 면역학적 및 크로마토그래피 기술을 포함한다. 예를 들어, 항체는 표준 항-항체 컬럼(예를 들어, 단백질-A 또는 단백질-G 컬럼)을 사용하여 정제될 수 있다. 단백질 농도와 함께, 한외여과 및 정용여과 기술도 유용하다. 예를 들어, 문헌 [Scopes (1994) "Protein Purification, 3rd edition," Springer-Verlag, New York City, New York]을 참조하라. 필요한 정제 정도는 원하는 용도에 따라 달라질 것이다. 일부 예에서, 발현된 항체 또는 이의 단편의 정제가 필요하지 않을 것이다.
- [0180] 정제된 항체 또는 이의 단편의 수율 또는 순도를 결정하기 위한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 브래드포드(Bradford) 검정, UV 분광법, 뷰렛(Biuret) 단백질 검정, 로우리(Lowry) 단백질 검정, 아미도 블랙 단백질 검정, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 질량 분석(MS) 및 겔 전기영동 방법(예를 들어, 쿠마시 블루 또는 콜로이드성 은 염색과 같은 단백질 염색을 사용)을 포함한다.
- [0181] 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이들의 발현 및 정제 후에 변형될 수 있다. 변형은 공유 또는 비공유 변형일 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 폴리펩티드의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 함께 반응시킴으로써, 항체 또는 단편에 도입될 수 있다. 변형에 적합한 부위는, 예를 들어 항체 또는 단편의 구조 분석 또는 아미노산 서열 분석을 포함하는 다양한 기준 중 임의의 것을 사용하여 선택될 수 있다.
- [0182] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중 모이어티에 접합될 수 있다. 이중 모이어티는, 예를 들어 이중 폴리펩티드, 치료제 또는 세포독성제(예를 들어, 독소 또는 약물) 또는 검출가능한 표지, 예컨대 비제한적으로 방사성 표지, 효소 표지, 형광성 표지, 중금속 표지, 발광성 표지 또는 친화도 태그, 예컨대 비오틴 또는 스트렙타비딘일 수 있다. 적합한 이중 폴리펩티드는, 예를 들어 항체 또는 단편을 정제하는 데 사용하기 위한, 항원 태그(예를 들어, 플래그(FLAG)(DYKDDDDK(서열번호: 44)), 폴리히스티딘(6-His; HHHHHH(서열번호: 45)), 혈구응집소(HA; YPYDVPDYA(서열번호: 46)), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 말토스-결합 단백질(MBP))를 포함한다. 또한, 이중 폴리펩티드는 진단 또는 검출가능한 마커, 예를 들어 루시페라제, 형광성 단백질(예를 들어, 녹색 형광성 단백질(GFP)) 또는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)로서 유용한 폴리펩티드(예를 들어, 효소)를 포함한다. 적합한 방사성 표지는, 예를 들어 ³²P, ³³P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S 및 ³H를 포함한다. 적합한 형광성 표지는, 비제한적으로 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 녹색 형광성 단백질(GFP), 다이라이트(DyLight)TM 488, 파이크오티트린(PE), 프로피듐 아이오다이드(PI), PerCP, PE-알렉사 플루오르(Alexa Fluor)[®] 700, Cy5, 알로파이코시아닌 및 Cy7을 포함한다. 발광성 표지는, 예를 들어 다양한 임의의 발광성 란타나이드(예를 들어, 유로퓸 또는 테르븀) 킬레이트를 포함한다. 예를 들어, 적합한 유로퓸 킬레이트는 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(DTPA) 또는 테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)의 유로퓸 킬레이트를 포함한다. 효소 표지는, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, CAT, 루시페라제 및 홀스래디시 페록시다제를 포함한다.
- [0183] 2개의 단백질(예를 들어, 항체 및 이중 모이어티)은 다수의 알려진 화학적 교차연결제 중 임의의 것을 사용하여 교차연결될 수 있다. 이러한 교차연결제의 예는 "부자유(hindered)" 디설파이드 결합을 포함하는 연결을 통해 2개의 아미노산 잔기를 연결하는 것이다. 이러한 연결에서, 교차연결 단위 내의 디설파이드 결합은, 예를 들어 환원된 글루타티온 또는 효소 디설파이드 환원효소의 작용에 의한 환원으로부터 (디설파이드 결합의 양쪽에 있는 부자유 기에 의해) 보호된다. 하나의 적합한 시약인 4-숙신이미딜옥시카보닐- α -메틸- α -(2-피리딜디티오) 톨루엔(SMPT)은, 단백질 중 하나의 말단 라이신과 다른 하나의 말단 시스테인을 활용하여 두 단백질 사이에 그러한 연결을 형성한다. 또한, 각각의 단백질의 다른 커플링 모이어티에 의해 교차연결하는 이중작용성 시약이 사용될 수 있다. 다른 유용한 교차연결제는, 비제한적으로 2개의 아미노기를 연결하는 시약(예를 들어, N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시숙신이미드), 2개의 설프하이드릴기를 연결하는 시약(예를 들어, 1,4-비스-말레이미도부탄), 아미노기 및 설프하이드릴기를 연결하는 시약(예를 들어, 말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르), 아미노기 및 카복실기를 연결하는 시약(예를 들어, 4-[p-아지도살리실아미드]부틸아민), 및 아르기닌의 측쇄에 존재하는 구아니디늄기 및 아미노기를 연결하는 시약(예를 들어, p-아지도페닐 글리옥살 일수화물)을 포함한다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 방사성 표지는 항체의 아미노산 백본에 직접적으로 접합될 수 있다. 대안적으로, 방사성 표지는, 차례로 단백질 백본에 결합되는 (DOTA 또는 DTPA에 대한) 킬레이트, 또는 유리 아미노기에 결합하여 관

련 단백질의 메타-아이오도페닐(mIP) 유도체(예를 들어, Rogers et al.(1997) *J Nucl Med* 38:1221-1229 참조)를 형성하는 더 큰 분자의 일부(예를 들어, 메타-[125I]아이오도페닐-N-하이드록시숙신이미드([125I]mIPNHS)의 125I)로서 포함될 수 있다. 방사성 표지 또는 이를 함유하는 분자/킬레이트를 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편에 접합하는 방법이 당업계에 알려져 있다. 상기 방법은 단백질에 대한 방사성 표지 또는 킬레이트의 결합을 용이하게 하는 조건(예를 들어, pH, 염 농도 및/또는 온도) 하에서 방사성 표지와 함께 단백질을 항온처리하는 것을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 번호 6,001,329 참조).

[0185] 형광성 표지(때때로 "형광단"으로 지칭됨)를 단백질(예를 들어, 항체)에 접합시키기 위한 방법이 단백질 화학 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 형광단은 형광단에 부착된 숙신이미딜(NHS) 에스테르 또는 테트라플루오로페닐(TFP) 에스테르 모이어티를 사용하여 단백질의 유리 아미노 기(예를 들어, 라이신) 또는 설프하이드릴 기(예를 들어, 시스테인)에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 형광단은 설폰-SMCC와 같은 이중작용성 교차연결제 모이어티에 접합될 수 있다. 적합한 접합 방법은 항체 단백질 또는 이의 단편을, 단백질에 대한 형광단의 결합을 용이하게 하는 조건 하에 형광단과 함께 항온처리하는 것을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Welch and Redvanly(2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications," John Wiley and Sons(ISBN 0471495603)]을 참조하라.

[0186] 일부 실시양태에서, 항체 또는 단편은, 예를 들어 순환 시, 예를 들어 혈액, 혈청 또는 다른 조직에서 항체의 안정화 및/또는 보유를 개선하는 모이어티로 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 단편은, 예를 들어 문헌 [Lee et al.(1999) *Bioconjug Chem* 10(6): 973-8; Kinstler et al.(2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485]; 및 [Roberts et al.(2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476]에 기재된 바와 같이 PEG화되거나, HES화될 수 있다(독일, 프레제니우스 카비(Fresenius Kabi), 예를 들어, Pavisic et al.(2010) *Int J Pharm* 387(1-2):110-119 참조). 안정화 모이어티는 항체(또는 단편)의 안정성 또는 보유를 적어도 약 1.5배(예를 들어, 적어도 약 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40배 또는 50배 이상) 개선할 수 있다.

[0187] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 글리코실화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 효소 또는 화학적 처리를 받거나, 세포로부터 제조되어, 항체 또는 단편이 감소 또는 결여된 글리코실화를 갖게 할 수 있다. 글리코실화가 감소된 항체를 제조하기 위한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 6,933,368; 문헌 [Wright et al.(1991) *EMBO J* 10(10):2717-2723]; 및 [Co et al.(1993) *Mol Immunol* 30:1361]에 기재되어 있다.

[0188] 이중특이적 분자

[0189] 특정 실시양태에서, 본원은 이중특이적 분자를 형성하기 위해 사용될 수 있는 항원-결합 구성물을 제공한다. MHC 단백질(예를 들어, 항-NPM1c:MHC 클래스 I 항체) 또는 이의 항원-결합 단편과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프를 포함하는 항원에 대한 항체는, 또 다른 분자, 예를 들어 또 다른 펩티드 또는 단백질(예를 들어, 수용체에 대한 또 다른 항체 또는 리간드)에 대해 연결되거나 유도체화되어, 적어도 2 개의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성할 수 있다. 예를 들어, 항-NPM1c:HLA-A2 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 T-세포(예를 들어, CD3) 또는 자연 살해 세포에서 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)에 연결될 수 있다. 2개를 초과하는 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이적 분자는, 본원에 기재된 바와 같이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을, 하나 초과하는 다른 분자에 연결하거나 유도체화함으로써 생성될 수 있고; 상기 다중특이적 분자는 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이중특이적 분자"에 포함되도록 의도된다. 본원에 기재된 이중특이적 분자를 생성하기 위해, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (예를 들어, 화학적 커플링 또는 접합, 유전적 융합, 비공유 화합 또는 다른 것에 의해) 하나 이상의 다른 분자, 예컨대 또 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 연결되어, 이중특이적 분자가 생성되게 할 수 있다.

[0190] 따라서, 특정 실시양태에서, 본원은 MHC 단백질과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프(예컨대, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 대한 적어도 하나의 제1 결합 특이성(즉, 이중특이적 분자의 제1 항원-결합 도메인) 및 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성(즉, 이중특이적 분자의 제2 항원 결합 도메인)을 포함하는 이중특이적 분자를 제공한다. 이중특이적 분자가 다중특이적인 본원에 기재된 실시양태에서, 분자는 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다.

[0191] 특정 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 항원-결합 도메인 및 이중특이적 분자의 제2 항원-결합 도메인의 특이성은 동일하다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 분자의 제1 항원-결합 도메인 및 이중특이적 분자의 제2 항원

-결합 도메인의 특이성은 상이하다.

- [0192] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 분자는 적어도 하나의 항체 또는 이의 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일쇄 Fv(scFv) 또는 단일쇄 항체 분자를 포함한다. 또한, 항체는 이의 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는, 미국 특허 번호 4,946,778(Ladner *et al.*)에 기재된 바와 같이 경쇄 또는 중쇄 이량체 또는 이의 임의의 최소 단편, 예컨대 Fv 또는 단일쇄 구성물일 수 있다.
- [0193] 특정 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 이중특이적 단일-쇄 항체이다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자 내의 항원-결합 도메인 중 적어도 하나는 항체의 가변 영역의 단일-쇄 단편이다.
- [0194] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 분자에 사용된 항체 또는 항원 결합 단편은 인간(예를 들어, 인간 단클론성 항체)이다. 본원에 기재된 이중특이적 분자에 사용될 수 있는 다른 항체는 무린, 키메라 또는 인간화 항체(예를 들어, 무린, 키메라 또는 인간화 단클론성 항체)이다.
- [0195] 본원에 기재된 이중특이적 분자는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 구성 항원-결합 도메인을 접합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인 각각은 별도로 생성된 후, 서로 접합될 수 있다.
- [0196] 항원 결합 도메인이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링제 또는 교차연결제가 공유 접합에 사용될 수 있다. 교차연결제의 예는 단백질 A, 카보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이미드(oPDM), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC)를 포함한다(예를 들어, Karpovsky *et al.*(1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.*(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648 참조). 또 다른 방법은 문헌 [Paulus(1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.*(1985) *Science* 229:81-83] 및 [Glennie *et al.*(1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375]에 기재된 것들을 포함한다. 바람직한 접합제는 SATA 및 설포-SMCC이며, 둘 모두 피어스 케미칼 씨오(Pierce Chemical Co.)(락포드, 일리노이)로부터 입수가능하다.
- [0197] 항원-결합 특이성이 항체인 경우, 이들은 2개의 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 설프하이드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, 힌지 영역은 접합 전에 홀수 개의 설프하이드릴 잔기를, 바람직하게는 1개 함유하도록 변형된다.
- [0198] 대안적으로, 두 항원-결합 도메인은 동일한 벡터에 의해 인코딩될 수 있고, 동일한 숙주 세포에서 발현 및 어셈블링될 수 있다. 이러한 방법은 이중특이적 분자가 mAb & mAb, mAb & Fab, mAb & Fab', mAb & F(ab')₂, mAb & Fv, mAb & scFv, Fab & F(ab')₂, Fab & Fab, Fab' & Fab', F(ab')₂ & F(ab')₂, scFv & scFv, Fv & Fv 또는 리간드 & Fab 융합 단백질을 포함하는 경우에 특히 유용하다. 이중특이적 항체는 중쇄 각각의 C-말단에서 scFv를 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 이중특이적 분자는 하나의 단일쇄 항체 및 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 분자, 또는 2개의 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 이중특이적 분자일 수 있다. 이중특이적 항체는 중쇄 각각의 N-말단에서 scFv를 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 이중특이적 항체는 경쇄 각각의 N-말단 또는 C-말단에서 scFv를 포함하는 항체를 포함할 수 있다. 이중특이적 분자는 적어도 2개의 단일쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이적 분자를 제조하기 위한 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,260,203; 미국 특허 번호 5,455,030; 미국 특허 번호 4,881,175; 미국 특허 번호 5,132,405; 미국 특허 번호 5,091,513; 미국 특허 번호 5,476,786; 미국 특허 번호 5,013,653; 미국 특허 번호 5,258,498; 및 미국 특허 번호 5,482,858에 기재되어 있다.
- [0199] 특정 표적에 대한 이중특이적 분자의 결합은 효소 연결 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA), FACS 분석, 생물검정(예를 들어, 성장 억제) 또는 웨스턴 블롯 검정과 같이, 당업계에 공인된 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 이들 검정 각각은 일반적으로 관심 복합체에 대해 특이적인 표지된 시약(예를 들어, 항체)을 사용함으로써 관심 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다.
- [0200] 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피오프를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하고, 동시에 면역 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CD3) 또는 자연 살해 세포(예를 들어, NKp46 또는 CD16A) 상의 하나 이상의 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)한다. 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하고, 동시에 면역 이펙터 세포 상의 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합한다.

다. 일부 양태에서, 상기 결합은 중앙 세포에 대한 면역 이펙터 세포의 재-표적화를 가능하게 한다(예를 들어, Chames et al., 2009, MAbs 1:539-547 참조). 면역 이펙터 세포는, 비제한적으로 T 세포, 자연 살해 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포 및 B 림프구를 포함한다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에 의해 표적화된 면역 이펙터 세포는 T 세포(예를 들어, CD3), 자연 살해 세포(예를 들어, NKp46 또는 CD16A) 또는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv) 및 면역 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CD3), 자연 살해 세포(예를 들어, NKp46 또는 CD16A) 또는 대식세포 상의 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함한다.

[0201] 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프(예를 들어, NPM1c 네오에피토프)를 포함하는 항원에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하고, 동시에 다음과 같은 항원: CD3, NKp46, CD16A, CD40, CD47, 4-1BB, TGF- β , LAG-3, PD-1, TIM-3, CTLA-4, OX-40, NKp30, NKG2A, NKG2D 또는 DNAM-1 중 하나 이상에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CD3에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 NKp46에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CD16A에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CD40에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CD47에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 4-1BB에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 TGF- β 에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 LAG-3에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 PD-1에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 TIM-3에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CTLA-4에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 OX-40에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 NKp30에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 NKG2A에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 NKG2D에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 DNAM-1에 대해 제2 결합 특이성을 포함한다.

[0202] 일부 실시양태에서, 이중특이적 분자는 이중특이적 단일쇄 항체일 수 있다. 용어 "이중특이적 단일쇄 항체" 또는 "단일쇄 이중특이적 항체"는 완전 면역글로불린에 존재하는 불변 및/또는 Fc 부분(들)이 없는 단일 폴리펩티드 쇠에서 적어도 2개의 항체 가변 영역을 연결함에 따라 초래되는 항체 구성물을 지칭한다. 예를 들어, 이중특이적 단일쇄 항체의 항원-특이적 부분 각각은 항체 V_H 영역 및 항체 V_L 영역을 포함한다.

[0203] 이중특이적 단일쇄 항체의 유리한 변이체는 N 말단에서 C 말단으로 하기에 기재된다(여기서 "CD3"은 제2 특이성의 예로서 사용되지만, 또 다른 항원, 예를 들어 NKp46, CD16A, CD40, CD47, 4-1BB, TGF- β , LAG-3, PD-1, TIM-3, CTLA-4, OX-40, NKp30, NKG2A, NKG2D 또는 DNAM-1에 의해 치환될 수 있음):

[0204] $V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_H(CD3)-V_L(CD3)$,

[0205] $V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(CD3)-V_L(CD3)$,

[0206] $V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(CD3)-V_H(CD3)$,

[0207] $V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_L(CD3)-V_H(CD3)$,

[0208] $V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)$,

[0209] $V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)$,

[0210] $V_L(CD3)-V_H(CD3)-V_H(NPM1c:HLA-A2)-V_L(NPM1c:HLA-A2)$ 또는

[0211] $V_L(CD3)-V_H(CD3)-V_L(NPM1c:HLA-A2)-V_H(NPM1c:HLA-A2)$.

[0212] 바람직하게는, 본원의 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인은, 예를 들어 이들이 유래되는 항체 또는 면역글로불린 쇠의 결합 특이성과 적어도 실질적으로 동일한 특이성을 갖는다.

[0213] 특정 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CD3) 또는 자연 살해 세포(예를 들어, NKp46 또는 CD16A) 상의 하나 이상의 항원에 결합하는 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인은 항원에 대해 적어도 10^{-4} M, 적어도 10^{-5} M, 적어도 10^{-6} M 또는 적어도 10^{-7} M의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 면역 이펙터 세포, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CD3) 또는 자연 살해 세포(예를 들어, NKp46 또는 CD16A) 상의 하나 이상의 항원에 결합하는 항원-결합 도메인은 항원에 대해 10^{-7} M 이하(예를 들어, 10^{-4} M 내지 10^{-7} M 또는 10^{-5} M 내지 10^{-7} M)의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 항원에 결합하는 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인은 NPM1c:HLA-A2 항원에 대해 적어도 10^{-7} M 이상, 적어도 10^{-8} M 이상, 적어도 10^{-9} M 이상, 적어도 500 nM 이상, 적어도 250 nM 이상, 적어도 100 nM 이상, 적어도 50 nM 이상, 적어도 25 nM 이상, 적어도 20 nM 이상, 적어도 15 nM 이상 또는 적어도 10 nM 이상의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 항원에 결합하는 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인은 NPM1c:HLA-A2 항원에 대해 적어도 20 nM 이상, 적어도 15 nM 이상 또는 적어도 10 nM 이상의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 항원에 결합하는 이중특이적 분자의 항원-결합 도메인은 NPM1c:HLA-A2 항원에 대해 0.1 nM 및(또는 내지) 500 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 100 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 100 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 50 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 50 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 25 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 25 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 15 nM 사이, 0.5 nM 및(또는 내지) 15 nM 사이, 0.1 nM 및(또는 내지) 10 nM 사이, 또는 0.5 nM 및(또는 내지) 10 nM 사이, 또는 1 nM 내지 100 nM(또는 이들 사이의 임의의 값)의 결합 친화도(Kd)를 갖는다. 상기 항원-결합 도메인은 면역 이펙터 세포(예를 들어, CD3 항원) 상의 항원 상의 항원에 대해, 적어도 10^{-5} M, 예를 들어, 10^{-7} M 이하의 결합 친화도, 및 NPM1c:HLA-A2 항원에 대해, 예를 들어 10^{-8} M 이상, 50 nM 이상, 25 nM 이상, 15 nM 이상, 10nM 이상의 결합 친화도를 가질 수 있다. 본원의 이중특이적 분자의 특정 실시양태에서: (a) 상기 제1 항원-결합 도메인의 결합 부위(NPM1c:MHC 클래스 I에 결합)는 적어도 약 10^{-7} M, 적어도 약 10^{-8} M, 적어도 약 10^{-9} M, 적어도 약 500 nM, 적어도 약 100 nM, 적어도 약 50 nM 또는 적어도 약 25 nM 또는 적어도 약 15 nM의 친화도를 갖고/갖거나; (b) 상기 제2 항원-결합 도메인의 결합 부위는 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-6} M 미만 또는 대략 10^{-5} M 정도의 친화도를 갖는다. 본원의 이중특이적 분자의 일부 실시양태에서: (a) 상기 제1 항원-결합 도메인의 결합 부위(NPM1c:MHC 클래스 I에 결합)는 적어도 약 100 nM 또는 적어도 약 25 nM의 친화도를 갖고/갖거나; (b) 상기 제2 항원-결합 도메인의 결합 부위는 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-6} M 미만 또는 대략 10^{-5} M 정도의 친화도를 갖는다.

[0214] 앞서 기재된 특정 실시양태에 따르면, 이는, MHC 단백질과 복합체를 이루는 돌연변이체 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2 항원)를 포함하는 항원을 인식하는 결합 부위가 파괴될 표적 세포를 고효율로 포획하기 위해서 높은 친화도를 갖는 경우에 유리하다. 반면에, 면역 이펙터 세포(예를 들어, CD3 항원) 상의 항원을 인식하는 결합 부위의 결합 친화도는, 대략 항원에 대한 천연 수용체(예를 들어, CD3 수용체) 정도의 결합 친화도일 수 있거나, 표적 세포 표면 상의 MHC-펩티드 복합체인, 이의 리간드와 면역 이펙터 세포 수용체(예를 들어, T-세포 수용체)의 상호작용에 대해 일반적으로 확인되는 정도의 결합 친화도일 수 있다.

[0215] 본원의 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자의 상기 제1 및/또는 제2 도메인은 천연 항체로부터의 V_H 및 V_L 영역을 모방하거나 이에 상응한다. 본원의 이중특이적 분자에 대한 결합 부위를 제공하는 항체는, 예를 들어 단클론성 항체, 다클론성 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체, 합성 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab, Fv 또는 scFv 단편 등, 또는 이들 중 임의의 것의 화학적으로 변형된 유도체일 수 있다. 단클론성 항체는 예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256(1975), 495 and Galfre, Meth. Enzymol. 73(1981), 3]에서 본래 기재된 바와 같은 기술에 의해 제조될 수 있고, 이는 당업계에 의해 개발된 변형으로 면역화된 포유동물로부터 유래된 비장 세포에 마우스 골수종 세포를 융합하는 것을 포함한다. 또한, 전술한 항원에 대한 항체 또는 이의 단편은, 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988]에 기재된 방법을 사용함으로써 취득될 수 있다. 항체는 인간을 포함하여, 여러 종으로부터 취득될 수 있다. 상기 항체의 유도체가 파지 디스플레이 기술에 의해 취득될 경우, 비아코어(BIAcore) 시스템에서 사용되는 바와 같이 표면 플라즈몬 공명이 NPM1c:HLA-A2 또는 제2 항원에 결합하는 파지 항체의 효율을 증가시키기 위해 사용될 수 있다(Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97 105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7 13). 키메라 항체의 제조는, 예를 들어 WO 89/09622에 기재되어 있다. 인간화 항체의 제조 방법은, 예를 들어 EP-A1 0 239 400 및 WO 90/07861에 기재되어 있다. 본원에 따라 활용될 항체의

추가 원천은 소위 이중 항체이다. 마우스 내 인간 항체와 같은 이중 항체의 제조를 위한 일반적인 원리는, 예를 들어 WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 및 WO 96/33735에 기재되어 있다. 본원에 따라 활용될 항체의 또 다른 원천은, 예를 들어 문헌 [Chao et al., 2006, Nature Protocols 1(2):755-768]에 기재된 바와 같이, 효모 표면 디스플레이를 사용하여 단리되고 조작된 인간 항체이다.

[0216] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 분자의 NPM1c:HLA-A2 특이적 도메인은 서열번호: 11(ARLGYPPTTLLPFDY)에 따른 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR3, 서열번호: 10(ISGSGGST)에 따른 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR2 및/또는 서열번호: 9(GFTFSSYA)에 따른 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR1을 포함한다.

[0217] 또한, 본원의 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2 특이적 도메인의 하나 이상의 V_L 영역 CDR(들)을 포함할 수 있다. 상기 NPM1c:HLA-A2 특이적 도메인의 V_L 영역 CDR(들)은 서열번호: 8(QQSYSTPLT)에 따른 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR3, 서열번호: 7(AAS)의 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR2 및/또는 서열번호: 6(QSISY)에 따른 아미노산 서열이거나 이를 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR1을 포함할 수 있다.

[0218] 하나의 실시양태에서, 이중특이적 분자는 하나의 구성물에서 NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는 항체의 V_H 및/또는 V_L 의 CDR1, CDR2 및 CDR3(예를 들어, 본원에 기재된 CDR)을 포함한다.

[0219] 하나의 실시양태에서, 본원에 지칭된 항-NPM1c:HLA-A2 CDR은 IMGT 번호지정 시스템에 따른다. IMGT 번호지정 체계는 일관된 방식으로 항체 내 잔기를 번호지정하기 위해 널리 채택된 표준이다("IMGT®, 국제 면역유전학 정보 시스템(international ImmunoGeneTics information system)® 웹사이트 imgt.org 참조, 설립자 및 이사: 마리에-폴 레프랑크(Marie-Paule Lefranc), 몽펠리에, 프랑스; 예를 들어, [Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7:132-136] 및 [Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212]을 참조, 이들 모두 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0220] 특정 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 단편)는 NPM1c:HLA-A2 및 CD3에 동시에 결합한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2에 결합하는 단일-쇄 가변(scFv) 단편 및 CD3에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함한다.

[0221] 본원에 사용된 바와 같이, "인간 CD3"은 다분자 T 세포 수용체 복합체의 일부로서 인간 T 세포에서 발현되는 항원을 나타내며, CD3은 5개의 상이한쇄: CD3-엡실론, CD3-감마, CD3-델타, CD3-에타 및 CD3 제타로 구성된다.

[0222] 예를 들어, 항-CD3 항체에 의한 T 세포 상의 CD3 클러스터링은, 항원의 결합과 유사하지만 T 세포 서브세트의 클론 특이성과는 독립적인 T 세포 활성화를 초래한다. 따라서, 인간 CD3에 대한 이의 항원-결합 도메인 중 하나와 특이적으로 결합하는 이중특이적 분자는, 인간 T 세포 상에서 발현되는 인간 CD3 복합체에 결합할 수 있고, 표적 세포의 제거/용해를 유도할 수 있으며, 여기서 상기 표적 세포는 이중특이적 분자의 다른 비-CD3-결합 부분에 의해 결합되는 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)을 보유/디스플레이한다. CD3-특이적 바인더(예를 들어, 본원에 개시된 이중특이적 분자)에 의한 CD3 복합체의 결합은 당업계에 알려진 바와 같이 T 세포의 활성화를 초래하고; 예를 들어 WO 99/54440 또는 WO 2004/106381을 참조하라. 하나의 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 유리하게는 생체내 및/또는 시험관내 표적 세포를 제거/용해할 수 있다. 상응하는 표적 세포는 이중특이적 분자의 또 다른 항원-결합 도메인(즉, 이중특이적 분자의 비-CD3 결합 부분)에 의해 인식되는 종양 항원, 예를 들어 NPM1c:HLA-A2를 이의 표면 상에 발현하거나 디스플레이하는 세포일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 추가 특이성은 NPM1c:HLA-A2에 대한 것이다.

[0223] 본원의 하나의 실시양태에서, 이중특이적 분자의 CD3 특이적 도메인의 V_H 및 V_L 영역은, 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 및 F101.01로 이루어진 군으로부터 선택되는 CD3 특이적 항체로부터 유래된다. 이들 항체의 각각은 당업계에 잘 설명되어 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 8007796 및 미국 특허 번호 884088 참조).

[0224] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 분자의 CD3 특이적 도메인은 서열번호: 50(YDDHYCLDY)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR3, 서열번호: 49(YINPSRGYTNYNQKFKD)에 따른 아미노산 서열을

포함하는 적어도 하나의 V_H CDR2 및/또는 서열번호: 47(GYTFTRYTMH) 또는 서열번호: 48(RYTMH)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR1을 포함한다.

[0225] 일부 양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 CD3 특이적 도메인의 하나 이상의 V_L 영역 CDR(들)을 포함한다. 상기 CD3 특이적 도메인의 V_L 영역 CDR(들)은 서열번호: 53(QQWSSNPLT)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR3, 서열번호: 52의 아미노산 서열(DTSKVAS)을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR2 및/또는 서열번호: 51(RASSSVSYMN)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR1을 포함한다.

[0226] 하나의 실시양태에서, 이중특이적 분자는 하나의 구성물에서 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 V_H 및/또는 V_L 의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다(예를 들어, 본원에 기재된 CDR).

[0227] 하나의 실시양태에서, 상기 이중특이적 분자의 NPM1c:HLA-A2 특이적 도메인은 서열번호: 11(ARLGYPTTLLPFDY)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR3 영역을 포함하고, 상기 이중특이적 분자의 CD3 특이적 도메인은 서열번호: 49(YINPSRGYTNYNQKFKD)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR2 영역 및/또는 서열번호: 47(GYTFTRYTMH) 또는 서열번호: 48(RYTMH)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_H CDR1 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 이중특이적 분자는 각각의 항원-결합 항체의 V_L CDR(들)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 이중특이적 분자의 NPM1c:HLA-A2 특이적 도메인은 서열번호: 8(QQSYSTPLT)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR3 영역, 서열번호: 7(AAS)의 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR2 영역을 포함하고/하거나, 상기 CD3 특이적 도메인은 서열번호: 51(RASSSVSYMN)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 V_L CDR1 영역을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 앞서 기재한 CDR(예를 들어, CDR1, CDR2, CDR3)은 하나의 단일 이중특이적 분자에 포함된다.

[0228] 본원의 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 및 CD3 이중특이적 분자는 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 본원의 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 및 CD3 이중특이적 분자는 항-NPM1c:HLA-A2 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 본원의 NPM1c:HLA-A2 및 CD3 이중특이적 분자는 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 항-NPM1c:HLA-A2 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0229] 하나의 실시양태에서, 본원에 지칭된 항-CD3 CDR은 카밧 번호지정 시스템에 따른다. 카밧 번호지정 체계는 일관된 방식으로 항체 내 잔기를 번호지정하기 위해 널리 채택된 표준이다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0230] 본원의 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 및 CD3 이중특이적 분자는,

[0231] (a) 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열을 포함하는 NPM1c:HLA-A2 중쇄 가변 영역(V_H); 및/또는 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열을 포함하는 NPM1c:HLA-A2 경쇄 가변 영역(V_L);

[0232] 및

[0233] (b) CD3 특이적 항체(예를 들어, OKT-3, X35-3, VIT3, BMA030(BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2 및 F101.01로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체) 유래의 CD3 중쇄 가변 영역(V_H) 및/또는 경쇄 가변 영역(V_L)

[0234] 을 포함한다.

[0235] 본원의 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2 및 CD3 이중특이적 분자는,

[0236] (a) 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열을 포함하는 NPM1c:HLA-A2 중쇄 가변 영역(V_H); 및 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열을 포함하는 NPM1c:HLA-A2 경쇄 가변 영역(V_L);

[0237] 및

[0238] (b) CD3 특이적 항체(예를 들어, OKT-3, X35-3, VIT3, BMA030(BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-

409, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2 및 F101.01으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체) 유래의 CD3 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)

- [0239] 을 포함한다.
- [0240] 자연 살해(NK) 세포 활성화는 활성화 및 억제 신호를 모두 포함하는 복잡한 메커니즘에 의해 조절된다. HLA 클래스 I 결핍 표적 세포의 NK 세포 매개 인식 및 사멸에 중요한 역할을 하는 몇 가지 별개의 NK 세포 수용체가 확인되었다. 하나의 수용체는, NK 세포에 특이적이지 않지만, NK 세포 매개 세포독성(ADCC)을 담당하는 Fc γ RIIIA(CD16A)이다. 또 다른 NK 세포 수용체는 Ig 슈퍼패밀리의 구성원인 Nkp46이다. 이는 NK 세포에 특이적이며, 특정 mAb에 의해 유도된 이의 교차연결은, 강력한 NK 세포 활성화를 초래하며 이는 세포내 Ca⁺⁺ 수준 증가, 세포독성의 촉발 및 림포카인 방출로 이어진다.
- [0241] 일부 양태에서, 본원의 이중특이적 분자(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 단편)는 NPM1c:HLA-A2 및 Nkp46에 동시에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 종양 세포 상에서 발현되거나 디스플레이된 NPM1c:HLA-A2, 및 NK 세포 상에서 발현된 Nkp46에 동시에 결합한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2를 인식하는 단일-쇄 가변(scFv) 단편, 및 Nkp46에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함한다. Nkp46에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 항원 결합 단편이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, WO 15/197593, WO 17/114694 참조).
- [0242] 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 단편)는 NPM1c:HLA-A2 및 CD16A에 동시에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원의 이중특이적 분자는 종양 세포 상에서 발현되거나 디스플레이된 NPM1c:HLA-A2, 및 NK 세포 상에서 발현된 CD16A에 동시에 결합한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 분자는 NPM1c:HLA-A2를 인식하는 단일-쇄 가변(scFv) 단편 및 CD16A에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함한다. CD16A에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 항원 결합 단편이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Stein et al., (2012) Antibodies 1:88-123 및 여기서 인용된 참조문헌 참조).
- [0243] 일부 실시양태에서, 본원에 의해 제공되는 이중특이적 분자의 NK 세포에 대한 결합은 NK 세포를 활성화시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 의해 제공되는 이중특이적 분자의 NK 세포에 대한 결합은 NK 세포 항-종양 활성을 유도한다. 일부 실시양태에서, 본원에 의해 제공되는 이중특이적 항체의 NK 세포에 대한 결합은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 유도한다.
- [0244] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원은,
- [0245] (i) 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인; 및
- [0246] (ii) CD3, Nkp46, CD16A, CD40, CD47, 4-1BB, TGF- β , LAG-3, PD-1, TIM-3, CTLA-4, OX-40, Nkp30, NKG2A, NKG2D 또는 DNAM-1 중 하나에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인
- [0247] 을 포함하는, 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다.
- [0248] 일부 실시양태에서, 본원은,
- [0249] (i) 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인; 및
- [0250] (ii) CD3(예를 들어, 인간 CD3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 도메인은 T 세포 상에서 발현되는 인간 CD3에 특이적으로 결합한다.
- [0251] 일부 실시양태에서, 본원은,
- [0252] (i) 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인; 및
- [0253] (ii) Nkp46(예를 들어, 인간 Nkp46)에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 도메인은 자연 살해(NK) 세포 상에서 발현되는 인간 Nkp46에 특이적으로 결합한다.

- [0254] 일부 실시양태에서, 본원은,
- [0255] (i) 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인; 및
- [0256] (ii) CD16A(예를 들어, 인간 CD16A)에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원-결합 도메인은 NK 세포 상에서 발현되는 인간 CD16A에 특이적으로 결합한다.
- [0257] 일부 실시양태에서, NPM1c 네오에피토프는 AIQDLCVAV(서열번호: 71), CLAVEEVSL(서열번호: 72), VEEVSLRK(서열번호: 73), AVEEVSLR(서열번호: 74), AVEEVSLRK(서열번호: 75) 및 CLAVEEVSLRK(서열번호: 76)으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함한다.
- [0258] 일부 실시양태에서, MHC 클래스 I 단백질은 HLA-A*02 대립유전자 군을 포함하는 HLA-A 대립유전자에 의해 인코딩된다. 일부 실시양태에서, HLA-A 대립유전자는 HLA-A*02:01이다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, VH는 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열을 포함하고, VL는 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열을 포함한다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, VH는 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, VH는 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, VH는 서열번호: 5에 따른 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호: 3에 따른 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0262] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은, 각각 서열번호: 9, 10 및 11에 따른 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3 서열, 및/또는 각각 서열번호: 6, 7 및 8에 따른 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3 서열을 포함한다.
- [0263] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은, 각각 서열번호: 9, 10 및 11에 따른 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3 서열, 및 각각 서열번호: 6, 7 및 8에 따른 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3 서열을 포함한다.
- [0264] 일부 실시양태에서, 제1 항원-결합 도메인은 scFv, Fab 또는 F(ab')₂를 포함하고, 제2 항원-결합 도메인은 scFv 및 Fab 또는 F(ab')₂를 포함한다.
- [0265] 본원에 따라 사용될 항체 또는 이의 상응하는 면역글로불린쇄(들)은 당업계에 알려진 통상적인 기술, 예를 들어 아미노산 결실(들), 삽입(들), 치환(들), 추가(들) 및/또는 재조합(들), 및/또는 당업계 알려진 다른 임의의 변형(들)을, 단독으로 또는 조합하여 사용함으로써 추가로 변형될 수 있다. 면역글로불린쇄의 아미노산 서열의 기초를 이루는 DNA 서열에 이러한 변형을 도입하기 위한 방법이 당업자에게 잘 알려져 있으며; 예를 들어 문헌 [Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory(1989) N.Y.]를 참조하라. 지칭된 변형은 바람직하게는 핵산 수준으로 수행된다.
- [0266] 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321(1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553(1992)]를 참조하라. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 제조는 2개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동-발현을 기초로 하며, 여기서 2개의 중쇄/경쇄 쌍은 상이한 특이성을 갖는다(Milstein and Cuello, (1983) *Nature* 305:537-539). 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합될 수 있다. 중쇄 가변 영역의 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는, 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 이중특이적 항체를 생성하기 위해 현재 알려진 예시적인 방법에 대한 추가 세부사항의 경우, 예를 들어, 문헌 [Suresh *et al.*, (1986) *Methods Enzymol.* 121:210]; PCT 공개 번호 WO 96/27011; 문헌 [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]; 및 [Tutt et al., (1991) *J. Immunol.* 147:60]를 참조하라. 또한, 이중특이적 항체는 교차연결 또는 이중접합 항체를 포함한다. 이중접합체 항체는 임의의 편리한 교차연결 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 교차연결제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 미국 특허 번호 4,676,980에 다수의 교차연결 기술과 함께 개시되어 있다.

[0267] 또한, 재조합 세포 배양물로부터 직접 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 기재되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼(zipper)를 사용하여 제조되었다. 예를 들어, 문헌 [Kostelny et al.(1992) *J Immunol* 148(5):1547-1553]을 참조하라. Fos 및 Jun 단백질 유래 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결될 수 있다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 재-산화되어 항체 이중이량체를 형성할 수 있다. 또한, 이러한 방법은 항체 동종이량체의 제조에 활용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al.(1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448]에 의해 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적인 메커니즘을 제공하였다. 단편은, 동일한 쇠의 2개의 도메인 사이에 쌍이 이루어지게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 VH 및 VL 도메인은 또 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루도록 강제되어, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 또한, 단일-쇄 Fv(scFv) 이량체의 사용에 의해 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 보고되었다. 예를 들어, 문헌 [Gruber et al.(1994) *J Immunol* 152:5368]를 참조하라. 대안적으로, 항체는, 예를 들어 문헌 [Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062]에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 간략하게는, 이러한 항체는 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 분절(VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0268] 본원은 또한 문헌 [Wu et al.(2007) *Nat Biotechnol* 25(11): 1290-1297]에 기재된 이중 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig) 분자와 같은 다중-특이적 항체의 변이체 형태를 포함한다. DVD-Ig 분자는 2개의 상이한 모 항체 유래의 2개의 상이한 경쇄 가변 도메인(VL)이 일렬로 직접 연결되거나, 재조합 DNA 기술에 의해 짧은 링커를 통해 연결되고, 그 뒤에 이어서 경쇄 불변 도메인이 연결되도록 디자인된다. 유사하게는, 중쇄는, 일렬로 연결되고 그 뒤에 이어서 불변 도메인 CH1과 Fc 영역이 연결된 2개의 상이한 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 2개의 모 항체로부터 DVD-Ig 분자를 제조하기 위한 방법은, 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 08/024188 및 WO 07/024715에 추가로 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Fab-일렬 면역글로불린(Fab-in-Tandem immunoglobulin)이며, 이는 제2 특이성을 갖는 경쇄 가변 영역이 전체 항체의 중쇄 가변 영역에 융합된다. 상기 항체는, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2015/103072에 기재되어 있다.

[0269] **키메라 항원 수용체**

[0270] 하나의 양태에서, 본원은 세포의 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하고, 여기서 세포의 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 키메라 항원 수용체(CAR)는 신생항원(예를 들어, 암 또는 종양 신생항원)에 결합하는 세포의 도메인을 포함한다. 암 신생항원은 암 세포에서 발생하는 돌연변이로 인해 상기 암 세포에만 존재하는 항원이다. 암 항원은 세포내에서 발현될 수 있고, 암 세포 표면 상의 MHC 클래스 I 단백질에 의해 제시될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 고려되는 CAR에 의해 표적화된 암 신생항원은 NPM1c:HLA-A2일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원의 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 키메라 항원 수용체(CAR)를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용된다. 특정 실시양태에서, 본원은 세포의 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하고, 여기서 세포의 결합 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자를 포함하고, 상기 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자는 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-2)와 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프(예컨대 NPM1c 네오에피토프)에 결합한다.

[0271] CAR은 면역 이펙터 세포에서 발현될 때 상기 면역 이펙터 세포를 항원에 대해 지시하고, 일반적으로 면역 이펙터 세포를 자극하여 항원을 디스플레이하는 세포를 사멸시키는 유전자-조작된 인공 막-결합 단백질이다. 따라서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 항-종양 특이성과 같이 면역 이펙터 세포에 원하는 항원 특이성을 부여하기 위해 사용될 수 있다(특히, 항원 특이성은 CAR의 세포의 도메인에 의해 부여됨).

[0272] CAR은 일반적으로 세포 상에 디스플레이된 하나 이상의 항원에 결합하는 세포의 도메인, 막횡단 도메인 및 세포

의 도메인이 하나 이상의 항원에 결합할 때 면역 이펙터 세포에 활성화 신호를 전달하는 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, CAR은 3개의 도메인을 함유한다: 1) 전형적으로, 신호 펩티드, 리간드 또는 항원 인식 영역(예를 들어, scFv) 및 가요성 스페이서를 포함하는 세포외 도메인; 2) 막횡단(TM) 도메인; 3) 전형적으로, 하나 이상의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인(세포질 도메인으로도 알려짐). CAR의 세포외 도메인이 세포 외부에 있고 세포외 공간에 노출되어 있어, 이의 리간드/항원과의 상호작용에 도달할 수 있다. TM 도메인은 CAR이 이펙터 세포의 세포막에 고정될 수 있게 한다. CAR의 세포내 도메인은 세포외 도메인이 유래된 단백질과 상이한 신호 전달 단백질로부터 유래된 하나 이상의 세포질 도메인을 포함할 수 있다. 세포내 도메인은 CAR이 이의 리간드/항원에 결합할 때 이펙터 세포 활성화를 돕는다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포 활성화는 사이토카인 및 케모카인 생성의 유도뿐만 아니라 이펙터 세포의 세포용해 활성의 활성화를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포독성을 중앙 세포를 향해 전용(redirect)시킨다.

[0273] 표적 세포 표면 상의 이의 표적 항원과 CAR의 항원 결합 도메인의 교합(Engagement)은 CAR의 클러스터링을 초래하고, CAR-함유 세포에 활성화 자극을 전달한다. 일부 실시양태에서, CAR의 주요 특징은, 면역 이펙터 세포 특이성을 전용시켜서, 단클론성 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공동-수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 이용하여, 주요 조직적합성(MHC)에 무관한 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포 죽음을 매개할 수 있는 분자의 생성, 식세포작용, 사이토카인 생성 또는 증식을 촉발시키는 이의 능력이다. CD3 ζ 또는 FcR γ 유래의 신호전달 도메인을 함유하도록 조작된 scFv-기반 CAR은 T 세포 활성화 및 이펙터 기능에 대한 강력한 신호를 전달하는 것으로 나타났지만, 이들은 수반되는 공동-자극 신호의 부재 시 T 세포 생존 및 확장을 촉진하는 신호를 유도하기에 충분하지 않을 수 있다. 결합 도메인, 힌지, 막횡단, 및 CD3 ζ 또는 FcR γ 로부터 유래된 신호전달 도메인을 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인(예를 들어, CD28, CD137, CD134 및 CD278로부터 유래된 세포내 공동-자극 도메인)과 함께 함유하는 새로운 세대의 CAR은 동물 모델 및 암 환자에서, 시험관내 T 세포를 발현하는 CAR에서 항종양 활성뿐만 아니라 증가된 사이토카인 분비, 용해 활성, 생존 및 증식을 보다 효과적으로 지시하는 것으로 나타났다(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).

[0274] 일부 양태에서, 본원은 세포외(항원-결합) 도메인, 막횡단 도메인 및 항원-결합 도메인이 항원에 결합할 때 T 세포를 자극하기에 충분한 CD3 ζ 서열의 세포질 서열을 포함하는 세포내(세포질) 도메인, 및 선택적으로 항원-결합 도메인이 항원에 결합할 때 T 세포의 공동-자극을 준비시키는, 1개 이상(예를 들어, 2, 3 또는 4개)의 공동-자극 단백질의 세포질 서열(예를 들어, 하나 이상의 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 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드의 세포질 서열)을 포함하는 CAR을 제공한다. 일부 실시양태에서, CAR은 링커를 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 세포외(항원-결합) 도메인, 링커, 막횡단 도메인 및 세포내(세포질) 도메인을 포함하는 CAR 및 CAR-발현 면역 이펙터 세포의 추가적인 양태는, 예를 들어, 문헌 [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.* 18:377-384, 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]; 미국 특허 출원 공개 번호 2018/0057609; 2018/0037625; 2017/0362295; 2017/0137783; 2016/0152723, 2016/0206656,

2016/0199412, 2016/0208018, 2015/0232880, 2015/0225480; 2015/0224143; 2015/0224142; 2015/0190428; 2015/0196599; 2015/0152181; 2015/0140023; 2015/0118202; 2015/0110760; 2015/0099299; 2015/0093822; 2015/0093401; 2015/0051266; 2015/0050729; 2015/0024482; 2015/0023937; 2015/0017141; 2015/0017136; 2015/0017120; 2014/0370045; 2014/0370017; 2014/0369977; 2014/0349402; 2014/0328812; 2014/0322275; 2014/0322216; 2014/0322212; 2014/0322183; 2014/0314795; 2014/0308259; 2014/0301993; 2014/0296492; 2014/0294784; 2014/0286973; 2014/0274909; 2014/0274801; 2014/0271635; 2014/0271582; 2014/0271581; 2014/0271579; 2014/0255363; 2014/0242701; 2014/0242049; 2014/0227272; 2014/0219975; 2014/0170114; 2014/0134720; 2014/0134142; 2014/0120622; 2014/0120136; 2014/0106449; 2014/0106449; 2014/0099340; 2014/0086828; 2014/0065629; 2014/0050708; 2014/0024809; 2013/0344039; 2013/0323214; 2013/0315884; 2013/0309258; 2013/0288368; 2013/0287752; 2013/0287748; 2013/0280221; 2013/0280220; 2013/0266551; 2013/0216528; 2013/0202622; 2013/0071414; 2012/0321667; 2012/0302466; 2012/0301448; 2012/0301447; 2012/0060230; 2011/0213288; 2011/0158957; 2011/0104128; 2011/0038836; 2007/0036773; 및 2004/0043401에 기재되어 있다. 예시적인 세포외(항원-결합) 도메인, 링커, 막횡단 도메인 및 세포내(세포질) 도메인을 포함하는 CAR 및 CAR-발현 면역 이펙터 세포의 추가적인 양태는, WO 2016/168595; WO 12/079000; 2015/0141347; 2015/0031624; 2015/0030597; 2014/0378389; 2014/0219978; 2014/0206620; 2014/0037628; 2013/0274203; 2013/0225668; 2013/0116167; 2012/0230962; 2012/0213783; 2012/0093842; 2012/0071420; 2012/0015888; 2011/0268754; 2010/0297093; 2010/0158881; 2010/0034834; 2010/0015113; 2009/0304657; 2004/0043401; 2014/0322253; 2015/0118208; 2015/0038684; 2014/0024601; 2012/0148552; 2011/0223129; 2009/0257994; 2008/0160607; 2008/0003683; 2013/0121960; 2011/0052554; 및 2010/0178276에 기재되어 있다.

[0275] 일부 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 제공하고, 여기서 세포외 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 본원은 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및 세포외 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하고, 여기서 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자를 포함하고, 상기 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 분자는 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) NPM1c 네오에피토프를 포함하는 항원에 결합한다.

[0276] 일부 양태에서, 본원은 실시예 섹션에 기재된 NPM1c CAR의 세포내, 막횡단 및/또는 세포외 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다(예를 들어, 실시예 3 참조).

[0277] 일부 양태에서, 본원은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 2B4, DAP10, CD137 및 DAP12로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공동자극 분자의 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 CD3-제타 신호전달 도메인, 및 선택적으로 4-1BB 공동자극 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 CD3-제타, CD8, CD28, NKG2D, CD16, Nkp44 또는 Nkp46의 막횡단 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 CD8 막횡단 도메인을 포함하는 막횡단 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 에피토프(예를 들어, NPM1c 네오에피토프)를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) AIQDLCLAV(서열번호: 1) 네오에피토프를 포함하는 항원에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 VH 및 VL을 포함하는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 제공하고, 여기서 VH는 서열번호: 5의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 5와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호: 3의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 3과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원은 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1, 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2, 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 VH, 및/또는 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1, 서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2, 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어,

scFv)을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3, 즉 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 VH의 CDR을 포함하는 VH, 및/또는 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3, 즉 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 VL의 CDR을 포함하는 VL을 포함하는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 scFv 또는 서열번호: 2와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 scFv를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다.

[0278] 본원에 제공된 CAR의 세포외, 막횡단 및 세포내 도메인의 예는 이하에 기재된다.

[0279] CAR의 세포외(항원 결합) 도메인을 포함하는, 항체 항원 결합 도메인

[0280] 항원 결합 도메인의 비-제한적 예는 단클론성 항체(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE 및 IgD)(예를 들어, 완전 인간 또는 키메라(예를 들어, 인간화) 항체), 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 단편)(예를 들어, 완전 인간 또는 키메라(예를 들어, 인간화) 항체의 단편), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, scFv, scFv-Fc, (scFv)₂, scFab, bis-scFv, hc-IgG, BiTE, 단일 도메인 항체(예를 들어, V-NAR 도메인 또는 V_HH 도메인), IgNAR 및 다중특이적(예를 들어, 이중특이적 항체) 항체를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv를 포함한다. 이들 항원-결합 도메인의 제조 방법이 당업계에 알려져 있다.

[0281] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은, 면역글로불린 분자(예를 들어, 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 분자) 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로-활성(항원-결합) 단편과 같이, 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 적어도 1개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 CDR(예를 들어, 면역글로불린 경쇄 가변 도메인으로부터의 3개의 CDR 중 임의의 것 및/또는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인으로부터의 3개의 CDR 중 임의의 것)을 포함한다.

[0282] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 단일-쇄 항체(예를 들어, V-NAR 도메인 또는 V_HH 도메인 또는 본원에 기재된 바와 같은 단일-쇄 항체 중 임의의 것)이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 전체 항체 분자(예를 들어, 인간, 인간화 또는 키메라 항체) 또는 다량체 항체(예를 들어, 이중-특이적 항체)이다.

[0283] 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 항체 단편 및 다중-특이적(예를 들어, 이중-특이적) 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 항체 및 이의 항원-결합 단편의 예는, 비제한적으로 단일-쇄 Fvs(scFvs), Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂, 디설파이드-연결된 Fv(sdFv), Fv 및 VL 또는 VH 도메인을 함유하는 단편을 포함한다.

[0284] 본원에 제공된 추가적인 항원 결합 도메인은 다클론성, 단클론성, 다중-특이적(다량체, 예를 들어, 이중-특이적), 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단일-쇄 항체, 세포내-제조된 항체(즉, 인트라바디) 및 이의 항원-결합 단편이다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 종류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 IgG₁ 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 IgG₄ 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 면역글로불린이다.

[0285] 항원 결합 도메인의 추가적인 예는 IgG의 항원-결합 단편(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 항원-결합 단편)(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgG, 예를 들어, 인간 또는 인간화 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 항원-결합 단편), IgA의 항원-결합 단편(예를 들어, IgA1 또는 IgA2의 항원-결합 단편)(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgA, 예를 들어, 인간 또는 인간화 IgA1 또는 IgA2의 항원-결합 단편), IgD의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgD의 항원-결합 단편), IgE의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgE의 항원-결합 단편) 또는 IgM의 항원-결합 단편(예를 들어, 인간 또는 인간화 IgM의 항원-결합 단편)이다.

[0286] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은, 예를 들어 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수에서, 약 1×10^{-7} M 이상(예를 들어, 약 1×10^{-8} M 이상, 약 1×10^{-9} M 이상, 약 500 nM 이상, 약 100 nM 이상, 약 25 nM 이상, 약 15 nM 이상, 약 7 nM 이상, 약 5 nM 이상 또는 약 1 nM 이상)의 친화도(K_D)로, 특정 항원(예를 들어, 종양-관련 항원)에 결합할 수 있다.

[0287] 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, CAR에 포함하기 위한 항원 결합 도메인의 선택은 이를 필요로 하는

대상체에서 표적화될 세포(예를 들어, 암 세포 또는 종양)의 표면을 정의하는 리간드의 종류 및 수에 의존한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 암 신생항원과 같은 종양 특이적 항원(TSA)을 인식하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 종양 특이적 항원은 NPM1c:HLA-A2와 같이, MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) NMP1c 신생항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, NMP1c 신생항원은 아미노산 서열 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함한다.

[0288] 일부 실시양태에서, CAR 분자는 급성 골수성 백혈병의 종양 항원을 인식하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 급성 골수성 백혈병 신생항원과 같은 종양-특이적 항원(TSA)이다. TSA는 종양 세포에 대해 고유하며 신체 내의 다른 세포에서는 발생하지 않는다. 하나의 실시양태에서, 종양 항원은 종양 특이적 항원이다. 특정 실시양태에서, 종양-특이적 항원은 환자의 종양 세포를 서열분석하고 종양에서만 발견되는 돌연변이화된 단백질을 동정함으로써 결정된다. 이러한 항원이 "신생항원"으로 지칭된다. 일단 신생항원이 동정 되었으면, 이에 대한 치료 항체가 제조될 수 있고, 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 신생항원은 NPM1c 신생항원이다. 하나의 실시양태에서, NPM1c 신생항원은 NPM1c:HLA-A2와 같이, MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이룬다(또는 이에 의해 제시됨).

[0289] CAR 이펙터 세포(예를 들어, CAR T 세포)에 의해 표적화될 수 있는 종양 항원(예를 들어, 종양-관련 항원(TAA)) 및 종양-특이적 항원(TSA)은, 비제한적으로 NPM1c:HLA-A2를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 종양 특이적 항원은 NPM1c:HLA-A2이다.

[0290] CAR 도메인 사이의 링커

[0291] 본원은 (1) 세포외(항원 결합) 도메인 및 막횡단 도메인 사이의 링커, 및/또는 (2) 막횡단 도메인 및 세포내(세포질) 도메인 사이의 링커를 선택적으로 포함할 수 있는 CAR을 제공한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리펩티드 링커일 수 있다. 예를 들어, 링커는, 약 1 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산, 약 14 아미노산, 약 12 아미노산, 약 10 아미노산, 약 8 아미노산, 약 6 아미노산, 약 4 아미노산 또는 약 2 아미노산 사이; 약 2 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산, 약 14 아미노산, 약 12 아미노산, 약 10 아미노산, 약 8 아미노산, 약 6 아미노산 또는 약 4 아미노산 사이; 약 4 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산, 약 14 아미노산, 약 12 아미노산, 약 10 아미노산, 약 8 아미노산 또는 약 6 아미노산 사이; 약 6 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산, 약 14 아미노산, 약 12 아미노산 또는 약 10 아미노산 사이; 약 10 아미노산에서 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산, 약 14 아미노산 또는 약 12 아미노산 사이; 약 12 아미노산에서 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산 또는 약 14 아미노산 사이; 약 14 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산, 약 18 아미노산, 약 16 아미노산 또는 약 14 아미노산 사이; 약 16 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50

아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산, 약 20 아미노산 또는 약 18 아미노산 사이; 약 18 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산, 약 25 아미노산 또는 약 20 아미노산 사이; 약 20 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산, 약 35 아미노산, 약 30 아미노산 또는 약 25 아미노산 사이; 약 25 아미노산에서 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산 또는 약 35 아미노산 사이; 약 30 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산, 약 40 아미노산 또는 약 35 아미노산 사이; 약 35 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산, 약 50 아미노산 또는 약 40 아미노산 사이; 약 40 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산, 약 60 아미노산 또는 약 50 아미노산 사이; 약 50 아미노산에서 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산, 약 70 아미노산 또는 약 60 아미노산 사이; 약 60 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 150 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산, 약 80 아미노산 또는 약 70 아미노산 사이; 약 70 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산, 약 100 아미노산, 약 90 아미노산 또는 약 80 아미노산 사이; 약 80 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산 또는 약 90 아미노산 사이; 약 90 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산, 약 200 아미노산 또는 약 100 아미노산 사이; 약 100 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산, 약 300 아미노산 또는 약 200 아미노산 사이; 약 200 아미노산에서, 약 500 아미노산, 약 400 아미노산 또는 약 300 아미노산 사이; 약 300 아미노산에서, 약 500 아미노산 또는 약 400 아미노산 사이; 또는 약 400 아미노산에서 약 500 아미노산 사이의 길이를 가질 수 있다.

[0292] CAR의 막횡단 도메인

[0293] 또한, 본원에 제공된 CAR은 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 천연 원천으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 본원에 기재된 CAR에 사용될 수 있는 막횡단 도메인의 비-제한적인 예는 T-세포 수용체, CD28, CD3 엽실론, CD33, CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 또는 CD154의 알파, 베타 또는 제타쇄(예를 들어, 이들의 막횡단 서열의 일부 또는 막횡단 서열을 적어도 포함할 수 있음)로부터 유래될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD4 분자 유래이다. 하나의 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 분자 유래이다.

[0294] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 합성일 수 있다. 예를 들어, 막횡단 도메인이 합성 원천으로부터 유래한 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 소수성 잔기(예를 들어, 류신 및 발린)를 포함(예를 들어, 주로 포함)할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 막횡단 도메인은 합성 막횡단 도메인의 말단에 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트레플렛(triplet)을 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개) 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD8 힌지 도메인을 포함할 수 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포질 도메인의 서열과 자연적으로 관련된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 다른 막횡단 도메인(예를 들어, 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인)과의 도메인 결합을 피하기 위해 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 아미노산 치환에 의해 변형되어 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화할 수 있다.

[0296] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 CAR의 막횡단 도메인은 CD3-제타, CD8, CD28, NKG2D, CD16, NKp44 또는 NKp46의 막횡단 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 CAR의 막횡단 도메인은 CD3-제타, CD8 또는 CD28의 막횡단 도메인을 포함한다. 이러한 일부의 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공동자극 분자의 공동자극 도메인을 포함한다.

[0297] CAR의 세포내(세포질) 도메인

- [0298] 세포내 도메인은, 예를 들어 T 세포, NK 세포 또는 대식세포와 같은 면역 이펙터 세포의 활성화를 유발하는 신호를 전달하는 기능을 하는 것으로 알려진 임의의 폴리펩티드 도메인일 수 있다. 상기 도메인 또는 모티프는 CAR의 세포외 도메인이 표적 항원에 결합하는 것에 반응하여 T 림프구의 활성화에 필요한 1차 항원-결합 신호를 전달할 수 있다. 세포내 도메인의 예는, 비제한적으로 ILR쇄, CD28, 4-1BB 및 CD3ζ를 포함한다.
- [0299] 전형적으로, 세포내 도메인은 ITAM(면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프)을 포함한다.
- [0300] 하나의 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ 신호전달 서열(예를 들어, 이의 ITAM-함유 부분)이거나 이를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 세포내 도메인은 림프구 수용체쇄를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 세포내 도메인은 TCR/CDR3 복합 단백질을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 세포내 도메인은 Fc 수용체 서브유닛을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 세포내 도메인은 IL-2 수용체 서브유닛을 포함한다.
- [0301] 본원에 제공된 CAR의 세포내 도메인은 다음과 같은 2개의 별개의 클래스의 세포질 신호전달 서열을 포함할 수 있다: TCR을 통해 항원-의존적 활성화를 개시하는 신호전달 서열(1차 세포질 신호전달 서열)(예를 들어, CD3ζ 세포질 신호전달 서열), 및 항원-독립적 방식으로 작용하여, 2차 또는 공동-자극 신호를 제공하는 하나 이상의 공동-자극 단백질의 세포질 서열(2차 세포질 신호전달 서열).
- [0302] 특정 실시양태에서, 본원은, 항원 결합 도메인이 항원과 결합할 때 T 세포를 자극하기에 충분한 CD3ζ의 세포질 서열, 및 선택적으로 T 세포의 공동-자극을 준비시키는 하나 이상의 공동-자극 단백질의 세포질 서열(예를 들어, 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, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드, 및 본원에 기재되거나 당업계에 알려진 ITAM 서열 중 임의의 것 중 하나 이상의 세포질 서열)을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 단백질의 전체 세포내 신호전달 도메인은 CAR의 세포내 도메인 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 공동-자극 단백질의 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분(예를 들어, CAR-발현 면역 이펙터 세포에서 이펙터 기능 신호를 전달하는 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분)을 포함한다. 세포내 도메인에 포함될 수 있는 세포내 신호전달 도메인의 비-제한적 예는, 항원 수용체 교합 후 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체(TCR) 및 공동-수용체의 세포질 서열뿐만 아니라 적어도 1개(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 치환을 포함하는 이들 서열의 임의의 변이체를 포함하고, 동일하거나 대략 동일한 기능적 능력을 갖는다.
- [0303] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은, CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 신호전달 서열(들)과 조합되거나 그 자체로 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함하도록 디자인될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포질 도메인은 CD3ζ쇄 부분 및 공동자극 세포질 신호전달 서열을 포함할 수 있다. 공동자극 세포질 신호전달 서열은 공동자극 단백질(예를 들어, CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드)의 세포질 신호전달 서열을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다.
- [0304] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인 내의 세포질 신호전달 서열은 무작위 순서로 위치된다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인 내의 세포질 신호전달 서열은 특정 순서로 서로 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 링커)는 상이한 세포질 신호전달 서열 사이에 연결을 형성하기 위해 이용될 수 있다.
- [0305] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ의 세포질 신호전달 서열 및 공동자극 단백질 CD28의 세포질 신호전달 서열을 포함하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ의 세포질 신호전달 서열 및 공동자극 단백질 4-1BB의 세포질 신호전달 서열을 포함하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ의 세포질 신호전달 서열 및 공동자극 단백질 CD28 및 4-1BB의 세포질 신호전달 서열을 포함하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 4-1BB의 세포질 신호전달 서열을 포함하지 않는다.
- [0306] 일부 실시양태에서, CAR은 CD28, CD137(4-1BB로도 알려짐), CD134(OX40으로도 알려짐) 및 CD278(ICOS로도 알려짐)과 같은 단백질로부터 유래된 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD137로부터 유래된 공동-자극 도메인을 포함하지 않는다.
- [0307] 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 사이토카인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 자가-절단 도메인(예를 들어, P2A 자가-절단 펩티드) 및 사이토카인을 추가로 포함하고, 여기서 자가-절단 도메인의 절단은 사이토카인을 방출한다. 일부 실시양태에서, 자가-절단 도메인(예를 들어, P2A 자가-절단 펩티드) 및 사이토카인은 이의 세포내 도메인 및 CAR 단백질의 C-말단 단부에 위치된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 다

음 중 하나 이상이다: IL-12, IL-7, IL-13, IL-15, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 및 CCL19. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-12이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-7이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-13이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-15이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-4이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IL-10이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 TNF- α 이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 IFN- γ 이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 TGF- β 이다. 하나의 실시양태에서, 사이토카인은 CCL19이다. 사이토카인을 발현하기 위해 변형된 면역 이펙터 세포가 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 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 참조). 특정 실시양태에서, 사이토카인을 발현하기 위한 본원에 기재된 면역 이펙터 세포의 변형은 문헌 [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]; 또는 [Liu et al., 2018, Leukemia 32:520-531]에 기재된 것과 동일하거나, 본원에 기재된 방법을 따른다.

[0308] CAR-발현 면역 이펙터 세포

[0309] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 면역 이펙터 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산으로 형질 전환된 면역 이펙터 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 면역 이펙터 세포를 제공한다.

[0310] CAR을 보유하거나 발현하기 위해 사용될 수 있는 면역 이펙터 세포는, 비제한적으로 T 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포)이다. 하나의 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 NK 세포이다. 하나의 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 대식세포이다.

[0311] 일부 양태에서, 본원에 제공된 면역 이펙터 세포는 말초혈액, 제대혈 또는 림프액으로부터 단리되었거나 이로부터 확장되었다.

[0312] 일부 양태에서, 본원에 제공된 면역 이펙터 세포는 (본원에 기재된 CAR을 발현하기 위한 이의 변형 후) 이들이 투여될 대상체에 대해 자가유래이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 면역 이펙터 세포는 (본원에 기재된 CAR을 발현하기 위한 이의 변형 후) 이들이 투여될 대상체에 대해 동종이계이다. 동종이계 면역 이펙터 세포가 CAR-발현 면역 이펙터 세포를 제조하기 위해 사용되는 경우, 대상체에서 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시킬 면역 이펙터 세포가 선택될 수 있거나, 면역 이펙터 세포가 하나 이상의 면역억제제와 공동 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 대상체로부터 수득되고, 선택적으로 확장되고, 본원에 기재된 CAR을 발현하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환되고, 선택적으로 추가로 확장된다.

[0313] 일부 양태에서, 면역 이펙터 세포는 질환 또는 병태(예컨대, 암, 예를 들어 AML)를 가진 환자로부터 유래되고, 본원에 기재된 임의의 항원(예를 들어, 신생항원)에 대해 특이성을 갖는 적어도 하나의 CAR을 발현하도록 *in vivo*에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 항원은 MHC 클래스 I 단백질에 의해 제시되는 암 신생항원일 수 있다(예컨대, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질 네오에피토프를 포함하는 항원, 예를 들어 NPM1c:HLA-A2). 이러한 일부의 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는, MHC 클래스 I 단백질에 의해 제시되는 암 신생항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 특이성을 갖는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 후, 환자에서 암(예를 들어, NPM1c-양성 암, 예를 들어, AML)을 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 CAR에 대한 리간드 또는 항원의 특이적 결합에 의해 자극되거나 유도되고, 동일한 환자의 질환 또는 병태의 치료에 유용한 적어도 하나의 이펙터 기능(예를 들어, 사이토카인의 유도)을 수행한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는, 표적 또는 표적 세포(예를 들어, 암 세포)에 근접하게 되거나 이에 접촉하게 되었을 때, 표적 세포 상에서 이의 이펙터 기능(예를 들어, 세포독성 T 세포 반응)을 발현하는 T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포)이다(예를 들어, Chang and Chen(2017) *Trends Mol Med* 23(5):430-450 참조).

[0314] (예를 들어, 암 신생항원에 대한 CAR의 세포외 도메인의 결합에 의한) CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포의 자극은 CAR 면역 이펙터 세포의 하나 이상의 항암 활성의 활성화를 초래할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, CAR 면역 이펙터 세포의 자극은 사이토카인의 분비를 포함하여, CAR 면역 이펙터 세포의 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성의 증가를 초래할 수 있다.

- [0315] 일부 실시양태에서, CAR 이펙터 세포(예를 들어, CAR T 세포)는 본원에 기재된 임의의 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 결합하는 CAR 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 유용한 CAR 분자를 포함하는 면역 이펙터 세포(예를 들어, CAR T 세포)는, NPM1c:HLA-A2와 같이, MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 (또는 이에 의해 제시되는) NPM1c 네오에피토프에 결합하는 세포외 도메인을 포함하는 CAR을 발현한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 유용한 CAR 분자를 포함하는 면역 이펙터 세포(예를 들어, CAR T 세포)는 NPM1c:HLA-A2 결합 도메인을 포함하는 CAR을 발현한다.
- [0316] T 세포가 이의 동족 항원에 장기간 노출되면 이펙터 기능의 소진을 초래할 수 있고, 이는 감염 또는 형질전환된 세포의 지속을 가능하게 할 수 있다. 면역 관문 차단을 유도하는 작용제를 사용하여 숙주 이펙터 기능을 자극하거나 원상태로 되돌리기 위해 최근에 개발된 전략은 여러 암의 치료에 대한 성공이라는 결과를 가져왔다. 새로운 증거는 T 세포 소진이 키메라 항원 수용체-발현 T 세포(CAR T 세포)에 의해 오래-지속되는 항종양 활성을 유지하는 데 상당한 장애를 나타낼 수 있음을 시사한다. CAR 형질도입 전에 환자-수확된 T 세포의 분화 상태 및 CAR T 세포를 재도입하기 전에 환자가 겪는 컨디셔닝 요법(예를 들어, 알킬화제, 플루다라빈, 전신 방사선 조사)의 추가 또는 제외)은 CAR T 세포의 지속성 및 세포독성 잠재력에 극심하게 영향을 미칠 수 있다. 또한, T 세포 집단을 (항-CD3/CD28 또는 자극제 세포를 통해) 자극하고, (IL-2와 같은 사이토카인을 통해) 확장하는 시험관내 배양 조건은, CAR T 세포의 분화 상태 및 이펙터 기능을 변경할 수 있다(Ghoneim et al., (2016) *Trends in Molecular Medicine* 22(12):1000-1011).
- [0317] **CAR-발현 면역 이펙터 세포를 제조하는 방법**
- [0318] 본원은 본원에 기재된 임의의 CAR을 포함하는 본원에 기재된 임의의 면역 이펙터 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있는 방법을 제공한다.
- [0319] 일부 실시양태에서, 대상체의 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)는 키메라 항원 수용체로 유전적으로 변형된다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:388-398, 2013). 예를 들어, 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)가 제공되고, 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 재조합 핵산이 환자-유래 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 도입되어 CAR 세포를 생성한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 유래되지 않은 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)는 키메라 항원 수용체로 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)는, 셀렉티스(Collectis)에 의해 개발된 바와 같은, 유니버설 키메라 항원 수용체 T 세포(UCART, Universal Chimeric Antigen Receptor)와 같은 "기성품" 입양 세포 요법으로 사용되도록 조작된 동종이계 세포이다.
- [0320] 당업계에 알려진 다양한 다른 방법을 사용하여, 본원에 기재된 CAR을 인코딩하는 핵산 또는 본원에 기재된 CAR을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터 중 임의의 것을 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 도입할 수 있다. 핵산을 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 도입하기 위한 방법의 비-제한적 예는 리포펙션, 형질감염(예를 들어, 칼슘 포스페이트 형질감염, 고도로 분지된 유기 화합물을 이용한 형질감염, 양이온성 중합체를 이용한 형질감염, 덴드리머-기반 형질감염, 광학 형질감염, 입자-기반 형질감염(예를 들어, 나노입자 형질감염) 또는 리포솜(예를 들어, 양이온성 리포솜)을 이용한 형질 감염), 미세주사, 전기천공, 세포 압착(cell squeezing), 초음파천공(sonoporation), 원형질체 융합, 임페일펙션(impalefection), 유체역학적 전달, 유전자총, 자기감염(magnetofection), 바이러스 형질감염 및 뉴클레오펙션(nucleofection)을 포함한다. 더욱이, 당업계에 알려진 CRISPR/Cas9 게놈 편집 기술을 사용하여, CAR 핵산을 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 도입하고/하거나, 다른 유전적 변형을 (예를 들어, 하기 기재된 바와 같이) 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 도입하여, CAR T 세포 활성을 향상시킬 수 있다(CAR T 세포와 연계하여 CRISPR/Cas9 기술을 사용하는 경우, 예를 들어, US 9,890,393; US 9,855,297; US 2017/0175128; US 2016/0184362; US 2016/0272999; WO 2015/161276; WO 2014/191128; CN 106755088; CN 106591363; CN 106480097; CN 106399375; CN 104894068 참조).
- [0321] 일부 양태에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포를 제조하기 위한 방법은, (i) 말초 혈액, 제대혈 또는 림프액으로부터 (예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PMBC)로부터) 세포를 수득하는 단계, (ii) 선택적으로, 수득된 세포를 정제하는 단계, (iii) 선택적으로, 세포를 확장시키는 단계, (iv) 선택적으로, (예를 들어, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로) 세포를 활성화시키는 단계, (v) 선택적으로, 활성화된 세포를 확장시키는 단계, (vi) 본원에 기재된 CAR을 포함하는 발현 벡터로 세포를 형질도입하는 단계, (vii) CAR을 발현하는 세포를 분리하는 단계, 및 (viii) 선택적으로, 분리된 세포를 확장시키는 단계를 포함한다.

- [0322] 일부 양태에서, 본원에 기재된 면역 이펙터 세포를 제조하기 위한 방법은, (i) 전분화능 줄기 세포(iPSC)를 수득하는 단계, (ii) iPSC가 면역 이펙터 세포(예를 들어, NK 세포, 대식세포 또는 T 세포(예를 들어, CD8⁺ T 세포)로 분화하도록 유도하는 단계, (iii) 선택적으로, 면역 이펙터 세포를 확장시키는 단계, (iv) 본원에 기재된 CAR을 포함하는 발현 벡터로 면역 이펙터 세포를 형질도입하는 단계, (v) CAR을 발현하는 면역 이펙터 세포를 단리하는 단계, 및 (vi) 선택적으로, 단리된 세포를 확장시키는 단계를 포함한다.
- [0323] **조성물**
- [0324] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 제공한다. 약학 조성물에서 항체 또는 단편은 정제될 수 있다.
- [0325] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 이중특이적 분자(예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 제공한다. 약학 조성물에서 이중특이적 분자는 정제될 수 있다.
- [0326] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 면역 이펙터 세포(예를 들어, CAR 폴리펩티드 발현 면역 이펙터 세포)를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 제공한다.
- [0327] 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 비제한적으로 부형제 및 안정화제를 포함하는, 적절한 약학적으로 허용가능한 담체가 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, PA 참조).
- [0328] 약학 조성물은 세포, 테더링(tethering) 수단(예를 들어, 지질 나노입자) 및/또는 단백질 또는 펩티드를, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 인간 또는 본원에서 고려되는 다른 대상체에 투여하기에 적합한, 하나 이상의 호환가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질)에 포함하는 멸균 조성물일 수 있다. 담체는, 투여를 용이하게 하기 위해 세포, 테더링 수단(예를 들어, 지질 나노입자) 및/또는 단백질 또는 펩티드와 조합되는, 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분일 수 있다. 약학 조성물의 구성요소는 원하는 약학적 효율을 실질적으로 손상시킬 상호작용을 방지하는 방식으로 혼합된다.
- [0329] 약학적으로 허용가능한 담체는, 비제한적으로 완충액, 유화제, 현탁제, 분산제, 등장제, 습윤제, 킬레이트제, 금속이온 봉쇄제(sequestering agent), pH 완충제, 용해도 향상제, 항균제, 마취제, 및/또는 항산화제를 포함할 수 있다.
- [0330] 약학 조성물을 제형화하기 위한 다양한 부형제와 조성물을 제조하기 위한 기술이 당업계에 알려져 있다 (Remington: *The Science 및 Practice of Pharmacy*, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006 참조; 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨).
- [0331] 임의의 통상적인 부형제 매질이, 예컨대 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 생성하거나, 그렇지 않으면 유해한 방식으로 약학 조성물의 임의의 다른 구성요소(들)과 상호작용함으로써 물질 또는 이의 유효체와 호환되지 않을 수 있는 경우를 제외하고, 통상적인 부형제 매질의 사용이 본원의 범위 내에서 고려될 수 있다. 부형제는, 예를 들어 접착 방지제, 항산화제, 바인더, 코팅제, 압축 보조제, 봉해제, 염료(색소), 연화제, 유화제, 충전제(희석제), 필름 형성제 또는 코팅제, 활택제(유동 개선제), 윤활제, 방부제, 인쇄 잉크, 흡착제, 현탁 또는 분산제, 감미료 및 수화수를 포함할 수 있다. 예시적인 부형제는, 비제한적으로 식염수, 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트(이염기성), 칼슘 스테아레이트, 크로스카멜로스, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 시트르산, 크로스포비돈, 시스테인, 에틸셀룰로오스, 젤라틴, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 락토스, 수크로스, 텍스트로스, 마그네슘 스테아레이트, 맥아, 말티톨, 만니톨, 메티오닌, 메틸셀룰로오스, 메틸 파라벤, 미세결정질 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤, 에탄올, 폴리비닐 피롤리돈, 포비돈, 전분(예를 들어, 전호화 전분), 프로필렌, 프로필 파라벤, 레티닐 팔미테이트, 셀락, 실리카겔, 이산화규소, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 나트륨 시트레이트, 나트륨 스테아레이트, 나트륨 스타치 글리콜레이트, 소르비톨, 전분(옥수수), 스테아르산, 탈크, 베이스 크림, 이산화티타늄, 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 및 자일리톨을 포함한다.
- [0332] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 본원의 조성물에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 염의 예는, 비제한적으로, 산 부가 염, 알칼리 또는 알칼리 토금속 염, 염기성 잔기의 무기산염 또는 유기산염, 예컨대 아민; 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염, 예컨대 카복실산 등을 포함한다. 대표적인 산 부가 염은 아세테이트, 아세트산, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤젠 설포산, 벤조에이트, 비설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포

레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설포네이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵토네이트, 헥사노에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 톨루엔설포네이트, 운데카노에이트 및 발레레이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘 등뿐만 아니라 비제한적으로 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민 및 에틸아민 등을 포함하는, 무독성 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온을 포함한다.

[0333] 약학 조성물은 대상체(예를 들어, 인간)에게 투여하기에 적합하도록 제형화될 수 있다. 약학 조성물은 임의의 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다.

[0334] 약학 조성물은, 이를 전신적으로 전달하는 것이 바람직할 경우, 주사에 의한 비경구 투여, 예를 들어 볼러스(bolus) 주사 또는 연속 주사용으로 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 주사 전에 용액 또는 현탁액으로 만들기 위해 적합한 액체 용액, 현탁액, 에멀전 또는 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제형은 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플, 또는 다중-투여 용기로 제공될 수 있다. 약학적 비경구 제형은 성분의 수용액을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같이, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 대안적으로, 성분의 현탁액은 유-계 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방유, 에센셜 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 에센셜 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드 또는 리포솜을 포함한다. 비경구로 투여되는 경우, 적합한 약학적으로 허용가능한 담체는, 비제한적으로 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS), 또는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 글루코스를 함유하는 용액을 포함할 수 있다.

[0335] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편, 이중특이적 분자 또는 CAR-발현 면역 세포는 본원에 개시된 약학 조성물에서 치료적 유효량으로 사용되거나 존재할 수 있다. 치료적 유효량은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0336] 본원에서 고려되는 약학적으로 허용가능한 조성물은 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편, 이중특이적 분자 또는 CAR-발현 면역 세포 이외에, 추가 항암제(예를 들어, 1, 2 또는 3개 이상의 본원에 기재된 임의의 항암제)를 포함할 수 있다.

[0337] 치료 방법 및 용도

[0338] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 세포, 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암 치료(암 증식 억제, 암 진행 억제)를 필요로 하는 대상체에서의 암 치료를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원은 NPM1c-양성 암을 치료하는 것을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이 "NPM1c-양성 암"은 *NPM1* 유전자 내 돌연변이(예를 들어, *NPM1* 내 4 nt 중복 돌연변이)를 갖는 종양 세포를 포함하는 암을 지칭하고, 여기서 *NPM1* 내 돌연변이는 야생형 *NPM1*을 발현하는 세포와 비교할 때, 증가된 NPM1 단백질의 세포질 국소화를 야기한다. 특정 유전적 돌연변이(예를 들어, *NPM1* 내 4 nt 중복 돌연변이)의 존재를 결정하기 위해 암에서 유전자 발현을 측정하는 방법이 당업계에 알려져 있고, 이는 대상체로부터 수집된 악성 종양 샘플(예를 들어, 혈액, 골수, 종양 및/또는 조직 샘플)의 분석을 포함한다. 일부 양태에서, 유전자에서의 작은 중복, 삽입 또는 결실을 검출하기 위한 방법은 실시간 정량적 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR), 액적 디지털 PCR, 생어 서열분석 및 차세대 서열분석(예를 들어, 전체-게놈 서열분석, 예를 들어 전체-엑솜 서열분석)을 사용하여 수행된다. 일부 양태에서, NPM1c-양성 암은 *NPM1* 유전자의 돌연변이(예를 들어, 유전자의 엑손 12에서 4개 염기쌍 프레임시프트 삽입, 대안적인 리딩 프레임에서 C-말단 11개 아미노산을 인코딩하는 돌연변이, 또는 다음과 같은 C-말단 아미노산 서열: MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)를 포함하는 단백질의 발현을 초래하는 *NPM1* 돌연변이)를 갖는 것으로 검출된다. 일부 실시양태에서, NPM1c-양성 암은 NPM1 단백질의 증가된 세포질 국소화를 갖는 종양 세포를 포함한다. NPM1 세포 국소화를 평가하는 방법이 당업계에 알려져 있으며, 이는 예를 들어 표지된 항-NPM1 항체를 사용하고 현미경 또는 유세포 분석에 의해 국소화를 평가한다. 일부 실시양태에서, NPM1c-양성 암으로부터 단리된 종양 세포는 건강한 비-암성 조직 샘플로부터 단리된 세포와 비교할 때 NPM1 단백질의 증가된 세포질 국소화를 갖는다.

- [0339] 일부 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, NPM1c-양성 암 치료(예를 들어, 암의 증식 또는 진행 억제)를 필요로 하는 대상체에서 NPM1c-양성 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- [0340] 하나의 양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포, 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, AML 치료(예를 들어, AML의 증식 또는 진행 억제)를 필요로 하는 대상체에서 AML을 치료하는 것을 제공한다. 일부 실시양태에서, 환자는 뉴클레오포스민 1 유전자에 돌연변이를 보유한다. 일부 실시양태에서, AML은 뉴클레오포스민 1 유전자에서 돌연변이를 발현하는 종양 세포 또는 NPM1c-양성 종양 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원은 NPM1c-양성 AML 치료를 제공한다.
- [0341] 특정 실시양태에서, 본원의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv), 이중특이적 분자, CAR 폴리펩티드, CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포 또는 약학 조성물은 암 치료를 위해 표적화된 면역요법의 개발에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 NPM1c-양성 암이다.
- [0342] 특정 실시양태에서, 본원의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv), 이중특이적 분자, CAR 폴리펩티드, CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포 또는 약학 조성물은 AML의 치료를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, AML은 NPM1c-양성이다.
- [0343] 특정 실시양태에서, 본원의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv), 이중특이적 분자, CAR 폴리펩티드, CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포 또는 약학 조성물은 AML 세포를 사멸시키기 위한 세포독성제로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, AML 세포 또는 이의 아집단은 NPM1c-양성이다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 본원은 HLA-A2(즉, HLA-A*02:01 대립유전자)를 인코딩하는 대립유전자를 가진 대상체에서 NPM1c-양성 암(예를 들어, AML)을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, NPM1c-양성 암(예를 들어, AML)은 HLA-A2의 발현을 갖는 종양 세포를 포함한다. HLA 발현을 결정하는 방법이 당업계에 알려져 있고, HLA-A2를 인식하는 표지된 항체를 사용하는 웨스턴 블롯, 면역조직화학 및 유세포 분석을 포함한다. HLA 발현은 또한, RT-PCR 및 RNA 서열분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0345] 특정 실시양태에서, 본원은 암(예를 들어, NPM1c-양성 암, 예를 들어, AML) 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 것을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면은 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프를 디스플레이하고, 상기 치료는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0346] 특정 실시양태에서, 본원은 암(예를 들어, NPM1c-양성 암, 예를 들어, AML) 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 것을 제공하고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어 HLA-A*02 대립유전자 군에 의해 인코딩되는 단백질 또는 HLA-A2, 상기 단백질이 HLA-A*02:01 대립유전자에 의해 인코딩됨)과 복합체를 이루는 AIQDLCLAV(서열번호: 1) 네오에피토프를 디스플레이하고, 상기 치료는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0347] 특정 실시양태에서, 본원은, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암(예를 들어, 암은 NPM1c-양성이고, 예를 들어, 암은 AML임)을 가진 대상체에서 암 부담을 감소시키거나 생존을 증가시키는 것을 제공한다. 특정 실시양태에서, 암을 포함하는 세포의 세포 표면은 MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, 서열번호: 1)을 디스플레이한다.
- [0348] 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암으로부터 관해 중인 대상체에서 암을 예방하는 것을 제공한다.
- [0349] 하나의 실시양태에서, 암은 재발성 암이다. 하나의 실시양태에서, 암은 불응성 암이다. 하나의 실시양태에서,

암은 후기 단계의 암이다. 하나의 실시양태에서, 암은 하나 이상의 다른 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선 요법, 줄기 세포 이식 또는 또 다른 면역요법)에 저항성이다.

[0350] 특정 실시양태에서, 본원은, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편, 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 임의의 면역 이펙터 세포 또는 본원에 기재된 임의의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 AML의 예방을 필요로 하는 대상체에서 AML을 예방하는 것을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본원은 AML로부터의 관해 중인 대상체에서 AML을 예방하는 것을 제공한다.

[0351] 특정 실시양태에서, 치료될 암은 AML이다. 하나의 실시양태에서, 암은 재발성 AML이다. 하나의 실시양태에서, 암은 불응성 AML이다. 하나의 실시양태에서, 암은 후기 AML이다. 하나의 실시양태에서, 암은 하나 이상의 다른 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선 요법, 줄기 세포 이식 또는 또 다른 면역요법)에 저항성인 AML이다.

[0352] 본원에 기재된 임의의 요법의 효과는, 요법을 (예를 들어, 치료를 받는 대상체 또는 치료를 받는 암의 동물 모델에) 투여하기 전과 그 후의 매개변수(예를 들어, 종양 부담)를 평가함으로써 평가될 수 있다. 당업계에 알려진 임의의 검정을 이용하여 본원에 기재된 요법의 치료 효과를 평가할 수 있다.

[0353] 투여 방법

[0354] 본원에 기재된 요법은, 비제한적으로 비경구 투여 경로를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 환자에게 비경구로 투여된다. 적합한 비경구 투여 경로의 비-제한적 예는 정맥내, 근육내, 동맥내, 피하, 종양내, 척추강내 및 복강내 투여를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 정맥내 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 복강내 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 근육내 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 피하 투여된다. 특정 실시양태에서, 투여는 정맥내, 척추강내, 골내 또는 척수내이다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 척수 또는 척수관 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 척추강내 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 골내 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 골수 내로 투여된다.

[0355] 적절한 투여량은 치료를 받는 특정 암, 치료를 받는 대상체의 연령, 체중 및 신체 상태, 암의 중증도, 투여 경로, 치료 기간, 치료를 받는 대상체의 반응성, (있다면) 동시 또는 병용 요법의 본질, 특정 투여 경로 및 의료 종사자의 지식과 전문지식 내의 선호 인자에 따라 달라질 것이다. 특정 실시양태에서, 최대 허용가능한 투여량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 최고 안전 투여량이 사용될 것이다. 바람직한 실시양태에서, 요법은 유효량으로 투여될 것이다. 유효량은 의학적으로 바람직한 결과를 제공하기에 충분한 조성물의 투여량이다.

[0356] 예를 들어, 대상체가 종양을 갖는 경우, 유효량은 종양 부피 또는 하중(예를 들어, 종양을 영상화함으로써 결정됨)을 감소시키는 양일 수 있다. 유효량은 또한 혈액 또는 다른 체액 또는 조직(예를 들어, 생검)에서 암 세포의 존재 및/또는 빈도에 의해 평가될 수 있다. 종양이 조직 또는 장기의 정상적인 기능에 영향을 미치고 있다면, 유효량은 조직 또는 장기의 정상적인 기능을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0357] 특정 실시양태에서, CAR-발현 면역 이펙터 세포는 약 또는 적어도 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} 또는 5×10^{11} , 1×10^{12} 또는 5×10^{12} 세포(또는 이들 사이의 임의의 값이나 범위)의 양으로 투여된다.

[0358] 단일 투여 또는 일정 기간에 걸친 다중 투여를 포함하여 본원에 기재된 요법의 다양한 투여 일정이 고려된다. 투여 방법은, 비제한적으로 볼러스 투여 및 주사(예를 들어, 연속 주사 또는 펄스 주사)를 포함한다.

[0359] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 치료 요법은 1주에 2회, 매주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 매월 또는 4주마다 1회, 6주마다 1회, 2개월 또는 8주마다 1회, 3개월 또는 12주마다 1회의 요법의 투여를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 임의의 요법의 단일 투여를 받는다. 특정 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 임의의 요법의 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 8회 또는 적어도 10회의 투여를 받는다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 매일, 격일 또는 주 2회 투여된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 1년과 같은 기간 동안 투여된다.

[0360] 일부 실시양태에서, 초기 치료 기간(요법이 투여되는 경우, 예를 들어 단 1회, 1주 2회, 1주 1회, 2주에 2회 또는 1개월에 1회) 후에 항체가 투여되지 않는 휴약 기간이 (예를 들어, 1주, 2주, 3주, 1개월 또는 4주, 6주, 2

개월 또는 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 1년 동안) 이어지고, 그 후 제2 치료 기간(요법이 투여되는 경우, 예를 들어, 단 1회, 1주 2회, 1주 1회, 2주에 2회 또는 1개월에 1회)이 이어진다. 상기 초기 치료와 상기 제2 치료 기간은, 예를 들어 2주, 3주, 4주, 6주, 2개월 또는 3개월 지속될 수 있다(초기 치료 기간이 제2 치료 기간과 동일하거나 상이할 수 있음).

[0361] 환자 개체군

[0362] 본원에 기재된 방법에 따라 치료를 받는 대상체는, 비제한적으로 인간 및 비-인간 척추동물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료를 받는 대상체는 포유동물, 예컨대 애완동물(예를 들어, 개, 고양이, 토끼, 페럿 등), 가축 또는 농장 동물(예를 들어, 소, 돼지, 양, 염소, 돼지, 닭 또는 또 다른 가금류), 말(예를 들어, 서러브레드 말), 원숭이, 실험 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 등) 등이다. 또한, 대상체는 물고기 및 다른 수생 종을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료를 받는 대상체는 인간이다. 하나의 실시양태에서, 본원은 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료를 위해 표적화된 면역요법으로부터 이익을 얻을 가능성이 있는 임의의 대상체에서 실시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원은 NPM1c-양성 암(예를 들어, AML)을 갖는 대상체에서 사용하기 위한 것이다.

[0363] 일부 양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 본원에 기재된 임의의 면역요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 (또는 그럴 가능성이 있는) 암을 갖는 (예를 들어, 암으로 진단 받은) 임의의 대상체에서 실시될 수 있다. 암(예를 들어, NPM1c-양성 암, 예를 들어, AML)을 갖는 대상체는 검출가능한 암 세포를 갖는 대상체이다. 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv), 본원에 기재된 임의의 이중특이적 분자 및 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 임의의 면역 이펙터 세포를 암(예를 들어, NPM1c-양성 암, 예를 들어, AML)을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 고려한다.

[0364] 일부 양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 *NPM1* 유전자의 돌연변이(예를 들어, 유전자의 엑손 12에서 4개 염기쌍 프레임시프트 삽입, 대안적인 리딩 프레임에서 C-말단 11개 아미노산을 인코딩하는 돌연변이, 또는 다음과 같은 C-말단 아미노산 서열: MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)를 포함하는 단백질의 발현을 초래하는 *NPM1* 돌연변이)를 특징으로 하는 (예를 들어, *NPM1* 유전자의 돌연변이를 갖는 것으로 알려지거나, 이를 가질 것으로 예상되거나, 이를 갖는 것으로 검출되는) 암을 갖는 임의의 대상체에서 실시될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 돌연변이체 *NPM1* 단백질을(예를 들어, 세포질 국소화를 갖는 NPM1c 돌연변이체 단백질을, C-말단 도메인에 돌연변이를 갖는 단백질을, 폴딩된 C-말단 도메인이 없는 돌연변이체 단백질을, 다음과 같은 C-말단 아미노산 서열: MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)을 포함하는 단백질을, 서열번호: 56에 따른 단백질을 또는 NPM1c)의 발현을 특징으로 하는 (예를 들어, 돌연변이체 *NPM1* 단백질을 발현하는 것으로 알려지거나, 이를 발현할 것으로 예상되거나, 이를 발현하는 것으로 검출되는) 암을 갖는 임의의 대상체에서 실시될 수 있다. NPM1c의 돌연변이화된 C-말단 서열이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, van der Lee et al., 2019, J. Clin. Invest. 129(2):774-785 참조, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함됨, 예를 들어, 도 1 참조). 일부 양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 암을 갖는 임의의 대상체에서 실시될 수 있고, 여기서 암을 포함하는 세포의 세포 표면은 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 돌연변이체 뉴클레오포스민 네오에피토프(예컨대 NPM1c 네오에피토프, 예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1))을 (예를 들어, 디스플레이하는 것으로 알려지거나, 디스플레이할 것으로 예측되거나, 디스플레이하는 것으로 검출됨) 디스플레이한다. 일부 양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 암을 갖는 임의의 대상체에서 실시되고, 여기서 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)은 암을 포함하는 세포의 세포 표면 상에 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1))를 디스플레이하거나 제시한다.

[0365] 선택적으로, 본원에 기재된 방법에 따라 치료될 잠재적 환자의 암 세포는, *NPM1* 유전자 또는 NPM1 단백질의 돌연변이에 대해 테스트되거나, 암을 포함하는 세포의 세포 표면이 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1))를 포함하는 항원을 디스플레이하는지의 여부를 결정하기 위해 테스트된다. 일부 양태에서, 상기 테스트가, *NPM1* 유전자의 돌연변이 또는 NPM1 단백질의 돌연변이에 대해 양성이거나, 클래스 I 주요 조직적합성 복합체(MHC 클래스 I) 단백질(예를 들어, HLA-A2)과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, AIQDLCLAV(서열번호: 1))를 포함하는 항원을 암 세포의 세포 표면 상에 디스플레이하는 것으로 결정되면, 환자는 본원에 기재된 방법에 따라 치료된다.

[0366] 일부 양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 급성 골수성 백혈병(AML)을 갖는 대상체에서 실시될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원의 치료 방법 및 용도는 AML로 진단 받은 대상체에서 실시된다.

- [0367] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 암을 진단하기 위한 테스트가 당업계에 알려져 있으며, 이는 통상적인 의료 종사자에게 친숙할 것이다. 이러한 실험실 테스트는, 비제한적으로 현미경 분석, 배양 의존 테스트(예컨대 배양) 및 핵산 검출 테스트를 포함한다. 이들은, 습식 마운트, 염색-향상 현미경, 면역 현미경(예를 들어, FISH), 하이브리드화 현미경, 입자 응집, 효소-연결 면역흡착 검정, 소변 스크리닝 테스트, DNA 프로브 하이브리드화, 혈청학적 테스트 등을 포함한다. 의료 종사자는 일반적으로 전체 병력을 취득하고 앞서 나열된 실험실 테스트를 실행하는 것 외에도 완전한 신체 검사를 수행한다.
- [0368] AML의 검출 방법은, 비제한적으로 백혈병 세포에 대한 PBMC의 유세포 분석에 이어서 NPM1c 돌연변이에 대한 PCR 및 서열분석을 포함한다. AML 진단을 위한 임상적 방법이 당업계에 알려져 있다. AML 발병의 위험 인자는 흡연, 화학요법, 방사선 요법, 특정 혈액 장애 및 연령을 포함한다.
- [0369] 하나의 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 초기 단계의 암(예를 들어, AML)으로 진단 받았다. 하나의 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 후기 단계의 암(예를 들어, AML)으로 진단 받았다.
- [0370] 특정 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 AML 진행의 임의의 단계를 갖는다.
- [0371] 일부 양태에서, 치료를 받는 대상체는 이전에 하나 이상의 다른 암 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선요법 또는 줄기 세포 이식)을 받은 적이 있다. 특정 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 이전에 하나 이상의 다른 암 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선요법 또는 줄기 세포 이식)을 받은 적이 있고, 대상체의 암은 재발하였다. 특정 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 이전에 하나 이상의 다른 암 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선요법, 또는 줄기 세포 이식)을 받은 적이 있고, 대상체는 하나 이상의 다른 암 요법에 대한 저항성을 발달시켰다. 특정 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 관해 중(예를 들어, 암의 부분 관해 또는 완전한 관해 중)에 있다. 특정 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 하나 이상의 다른 암 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선요법 또는 줄기 세포 이식)에 대해 불응성이다.
- [0372] 다른 실시양태에서, 본원은, 본원의 치료 방법 및 용도에 따라 본원에 기재된 임의의 면역요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 (또는 그럴 가능성이 있는) 암이 발병할 위험이 있는 대상체를 치료하는 것을 고려한다. 암(예를 들어, AML)이 발병할 위험이 있는 대상체는 정상보다 높은 암 발병 확률을 갖는 대상체이다. 이러한 대상체는, 예를 들어, 더 높은 암 발병 가능성과 관련된 것으로 입증되어 있는 유전적 이상을 갖는 대상체, 암에 대한 가축력을 갖는 대상체, 암 유발 작용제(즉, 발암 물질), 예컨대 담배, 석면 또는 다른 화학적 독소에 노출된 대상체, 및 이전에 암에 대해 치료 받았고 명백히 관해 중인 대상체를 포함한다. 본원은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv), 본원에 기재된 이중특이적 분자 및 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 발현하는 면역 이펙터 세포를 암(예를 들어, AML)이 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 고려한다.
- [0373] 하나의 실시양태에서, 치료를 받는 대상체는 성인이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 18세 초과(또는 18세 미만)의 인간 대상체이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 21세 초과(또는 21세 미만)의 인간 대상체이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 45세 초과(또는 45세 미만)의 인간 대상체이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 65세 초과(또는 65세 미만)의 인간 대상체이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 18세 미만(또는 18세 내지 45세, 또는 21세 내지 45세)의 인간 대상체이다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 45세 미만(또는 18세 내지 45세, 21세 내지 65세, 또는 45세 내지 65세)의 인간 대상체이다.
- [0374] **병용 요법**
- [0375] 일부 양태에서, 본원에 기재된 치료 방법 및 용도는 치료 반응을 향상시키는 추가 작용제, 예컨대 대상체에서 항-종양 반응을 향상시키고/시키거나 종양에 세포독성인 추가 작용제로 대상체를 치료하는 것을 추가로 포함한다(예를 들어, 화학치료제).
- [0376] 일부 양태에서, 본원에 기재된 요법은 하나 이상의 항암 요법, 예를 들어, 화학요법, 방사선요법, 줄기 세포 이식, 항암 활성을 갖는 소분자, 또 다른 항암 면역요법(예를 들어, 또 다른 항암 항체 또는 이의 단편, 또는 또 다른 T 세포 요법), 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 항암 요법과 병용하여 대상체에 투여된다.
- [0377] 일부 양태에서, 본원에 기재된 항체, 항원 결합 항체 단편, 이중특이적 분자, 또는 이들을 포함하는 조성물 중 하나 이상은 하나 이상의 항암 요법, 예를 들어, 화학요법, 방사선요법, 줄기 세포 이식, 항암 활성을 갖는 소분자, 또 다른 항암 면역요법(예를 들어, 또 다른 항암 항체 또는 이의 단편, 또는 또 다른 T 세포 요법), 또는 당업계에 알려진 임의의 다른 항암 요법과 병용하여 대상체에 투여된다.
- [0378] 일부 양태에서, 본원에 기재된 CAR-발현 면역 이펙터 세포 또는 이를 포함하는 조성물 중 하나 이상은 줄기 세

포 이식 또는 또 다른 항암 면역요법(예를 들어, 또 다른 항암 항체 또는 이의 단편, 또는 또 다른 T 세포 요법)과 병용하여 대상체에 투여된다. CAR을 포함하는 면역 이펙터 세포와 함께 투여하기 위해, 면역 이펙터 세포의 생존력에 부정적인 영향을 미치지 않을 임의의 병용 요법이 본원에서 고려된다.

[0379] 병용 요법에 사용하기에 적합한 치료제는 단백질 티로신 키나제 억제제를 포함하는 소분자 화학치료제뿐만 아니라 비제한적으로 하기에 추가로 논의되는 것들을 포함하는 항암 항체와 같은 생물학적 항암제를 포함한다.

[0380] 일부 양태에서, 병용 요법은 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, PD-L2 억제제 또는 CTLA-4 억제제와 같이, 항-종양 면역력을 향상시키기 위한 면역 관문 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 면역 관문의 다른 조절제는 TIM-3, OX-40, OX-40L 또는 ICOS를 표적화할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 면역 관문을 조절하는 작용제는 항체(예를 들어, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3 또는 OX-40에 대한 길항 항체)이다. 또 다른 실시양태에서, 면역 관문을 조절하는 작용제는 단백질 또는 소분자 조절제이다. 또 다른 실시양태에서, 작용제(예컨대, mRNA)는 면역 관문의 항체 조절제를 인코딩한다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 TIM-3 억제제와 병용하여 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 PD-1 억제제와 병용하여 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 PD-L1 억제제와 병용하여 투여된다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 CTLA-4 억제제와 병용하여 투여된다. 병용 요법에 사용될 수 있는 면역 관문 억제제의 비-제한적 예는 펌브롤리주맙, 알렘투주맙, 니볼루맙, 피딜리주맙, 오파투주맙, 리톡시맙, MEDI0680, PDR001, AMP-224, PF-06801591, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, TSR-042, 아피머, 아벨루맙(MSB0010718C), 아테졸리주맙(MPDL3280A), 더발루맙(MEDI4736), BMS936559, 이필리루맙, 트레멜리루맙, AGEN1884, MEDI6469 및 MOXR0916을 포함한다.

[0381] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 화학요법과 병용하여 대상체에게 투여된다. 본원에 기재된 병용 요법에 사용될 수 있는 화학치료제 종류의 예는, 비제한적으로 알킬화제, 니트로소우레아제, 항대사물질, 백금 착물 유도체, 토포이소머라제 억제제, 아로마타제 억제제, 식물로부터 유래된 알칼로이드, 호르몬 길항제, 항종양 항생제 및 P-당단백질 억제제를 포함한다. 본원에 기재된 병용 요법에 사용될 수 있는 화학치료 약물의 구체적인 예는, 비제한적으로 탁솔, 파클리탁셀, nab-파클리탁셀, 5-플루오로우라실(5-FU), 젬시타빈, 독소루비신, 다우노루비신, 콜히신, 미토산트론, 타목시펜, 사이클로포스파미드, 메클로레타민, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 우라무스틴, 무스타르겐, 이포사미드, 벤다무스틴, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 포테무스틴, 스트렙토조신, 티오테파, 미토마이신, 디아지쿠온, 테트라진, 알트레타민, 다카르바진, 미토졸로미드, 테모졸로미드, 프로카바진, 핵사메틸멜라민, 알트레타민, 핵살렌, 트로포스파미드, 에스트라무스틴, 트레오설판, 만노설판, 트리아지쿠온, 카보쿠온, 니무스틴, 라니무스틴, 아자티오프린, 설파닐아미드, 플루오로피리미딘, 티오푸린, 티오구아닌, 머캅토푸린, 클라드리빈, 카페시타빈, 페메트렉세드, 플루다라빈, 메토티렉세이트, 하이드록시우레아, 넬라라빈 또는 클로파라빈, 시타라빈, 데시타빈, 프랄라트렉세이트, 플록수리딘, 티오과닌, 아자시티딘, 클라드리빈, 펜토스타틴, 머캅토푸린, 이마티닙, 닥티노마이신, 세루비딘, 블레오마이신, 악티노마이신, 루테오마이신, 에피루비신, 이다루비신, 폴리카마이신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈오렐빈, 빈데신, 빈플루닌, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에토포시드, 테니포시드, 페리왕클, 빈카, 탁산, 이리노테칸, 토포테칸, 캄프토테신, 테니포시드, 피라루비신, 노보비오신, 메르바론, 아클라루비신, 암사크린, 항안드로겐, 항-에스트로겐, 비칼루타미드, 메드록시프로게스테론, 플루옥시메스테론, 디에틸stil베스트롤, 에스트레이스, 옥트레오티드, 메게스트롤, 알록시펜, 토레미펜, 플베스트란트, 프레드니손, 플루타미드, 류프롤리드, 고세렐린, 아미노글루테티미드, 테스톨락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 엑세메스탄, 보로졸, 포르메스탄, 파드로졸, 안드로스텐, 레스베라트롤, 미오스민, 카테킨, 아피게닌 에리오디티올 이소리퀴리티게닌, 망고스틴, 아미오다론, 아지트로마이신, 캡토프릴, 클라리스로마이신, 사이클로스포린, 피페린, 퀘르세틴, 퀴니딘, 퀴닌, 레세르핀, 리토나비르, 타리퀴다르, 베라파밀, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 트랜스플라틴, 네다플라틴, 사트라플라틴, 트리플라틴 및 카보플라틴을 포함한다.

[0382] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 AML의 치료를 위한 하나 이상의 화학요법과 병용하여 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 화학요법은 시타라빈, 다우노루비신, 이다루비신, 클라드리빈, 플루다라빈, 미토산트론, 에토포시드, 6-티오구아닌, 하이드록시우레아, 프레드니손, 텍사메타손, 메토티렉세이트, 6-머캅토푸린, 아자시티딘 및 데시타빈으로부터 선택된다.

[0383] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 요법은 방사선 요법과 병용하여 대상체에게 투여된다.

[0384] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 줄기 세포 이식과 병용하여 대상체에게 투여된다.

[0385] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 요법은 하나 이상의 추가 항암 요법 전, 요법 중(즉, 동시에) 또는

요법 후에 투여될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료를 받는 대상체는 이전에 항암 요법을 받은 적이 없다. 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료를 받는 대상체는 이전에 항암 요법(예를 들어, 화학요법, 방사선 요법, 또는 줄기 세포 이식)을 받은 적이 있다.

[0386] **진단 용례**

[0387] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편 조성물은 진단 용례에 사용된다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 표지된 항체 또는 항원-결합 단편은 샘플(예를 들어, 생물학적 샘플)에서 표적 항원(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)의 존재 또는 양을 검출하기 위한 검정에 사용된다. 또 다른 예에서, 표적 항원(예를 들어, MHC I와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프, 예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 결합하는 본원에 기재된 바와 같은 표지된 항체 또는 항원-결합 단편은, 표적 항원에 결합하는 추가 화합물(예를 들어, 소분자, 압타머 또는 항체)을 동정하기 위해 양성 대조군으로서 사용된다.

[0388] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편 조성물은, 예를 들어 유세포 분석 또는 현미경에 의해, MHC I과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 제시하는 세포를 특징화하거나 동정하기 위한 시험관내 검정에 사용된다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편 조성물이 MHC I와 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 결합하는 일부 실시양태에서, 조성물은 샘플(예를 들어 생물학적 샘플)에서 표적 항원을 제시하는 세포를 동정하기 위해 사용된다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 환자에서 질환(예를 들어, 암, 예를 들어 *NPM1* 유전자에 돌연변이를 갖는 암, 예를 들어 *NPM1* 유전자에 돌연변이를 갖는 AML)의 진행을 진단, 예측 및/또는 결정하기 위해 사용된다.

[0389] **키트**

[0390] 하나의 양태에서, 본원은 (i) 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본원에 기재된 이중특이적 분자, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드, 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포), 또는 본원에 기재된 약학 조성물; (ii) 선택적으로, 하나 이상의 추가 항암제(예를 들어, 화학요법제) 및 (iii) 선택적으로, 대상체에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 지침서를 포함하는, 하나 이상의 용기를 포함하는 키트를 제공한다.

[0391] 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 바와 같은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 사용 지침서를 포함하는 키트에 관련된다. 키트는 본원에 개시된 바와 같은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 단일쇄 가변 항체 단편(scFv) 및 사용 지침서를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 바와 같은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 사용 지침서를 포함하는 키트에 관련된다. 특정 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 바와 같은 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원 및 제2 항원(CD3)에 결합하는 이중특이적 분자 및 사용 지침서를 포함하는 키트에 관련된다.

[0392] 하나의 실시양태에서, 키트는, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 완충액)를, 동일하거나 별개의 적합한 용기에 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 키트는, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 단일쇄 가변 항체 단편(scFv) 및 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 완충액)를, 동일하거나 별개의 적합한 용기에 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 키트는, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원 및 제2 항원(예를 들어, CD3)에 결합하는 이중특이적 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 완충액)를, 동일하거나 별개의 적합한 용기에 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 키트는, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드 및 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 완충액)를, 동일하거나 별개의 적합한 용기에 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 키트는, MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)를 포함하는 항원 및 제2 항원(예를 들어, CD3)에 결합하는 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포, 및 약학적으로 허용가능한 담체(예를 들어, 완충액)를, 동일하거나 별개의 적합한 용기에 포함할 수 있다.

- [0393] 적합한 용기는, 비제한적으로 바이알, 웰, 테스트 튜브, 플라스크, 병, 주사기, 주입 백, 또는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들어, scFv), 본원에 기재된 이중특이적 분자, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 CAR 폴리펩티드를 포함하는 면역 이펙터 세포가 배치될 수 있는 (일부 경우에, 적절히 분취될 수 있는) 다른 용기 수단을 포함할 수 있다. 추가 구성요소가 제공되는 경우, 키트는 이러한 구성요소가 배치될 수 있는 추가 용기를 함유할 수 있다. 용기는 원하는 바이알이 유지되는 주입 또는 취입-성형 플라스틱 용기를 추가로 포함할 수 있다. 용기 및/또는 키트는 사용 및/또는 경고용 지침서를 이용한 표지를 포함할 수 있다.
- [0394] 이하의 실시예는 한정이지 아니라 예시로 제공된다. 본원에 제공된 일반적인 설명이 주어지면, 본 발명의 다양한 다른 실시양태가 실시될 수 있다.
- [0395] **정의**
- [0396] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "NPM1c"는 세포질 국소화를 갖는, *NPM1* 유전자 내의 4-뉴클레오타이드 중복으로 인한, 돌연변이체 뉴클레오포스민 단백질(NPM1)을 지칭한다. 야생형 *NPM1* 유전자에 의해 인코딩된 인간 뉴클레오포스민은 서열 번호 54(수탁 번호 NM_002520)에 따른 아미노산 서열을 갖는다. 4-뉴클레오타이드 중복을 갖는 *NPM1* 유전자에 의해 인코딩된 예시적인 NPM1c 단백질은 서열번호: 56에 따른 아미노산 서열을 갖는다. 더욱이, 상기 예시적인 NPM1c 단백질의 C-말단 아미노산 서열은 굵게 하이라이트 처리된 야생형 뉴클레오포스민 단백질에 비해 돌연변이화된 서열의 일부를 갖는, MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)를 포함한다(예를 들어, van der Lee et al., 2019, JCI 129(2):774-785; Verhaak, R. et al(2005) *Blood* 106:3747 참조). 일부 실시양태에서, 본원의 NPM1c 네오에피토프는 아미노산 서열 MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)을 포함하는 NPM1c 단백질로부터 유래된 네오에피토프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원의 NPM1c 네오에피토프는 MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK(서열번호: 57)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 NPM1c의 일부로부터 유래된 네오에피토프를 포함한다.
- [0397] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "NPM1c:HLA-A2"는 HLA-A2 단백질과 복합체를 이루는 NPM1c의 네오에피토프를 지칭한다. 일부 실시양태에서, NPM1c의 네오에피토프는 아미노산 AIQDLCLAV(서열번호: 1)를 포함한다.
- [0398] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "YG1" 또는 "YG1 scFv"는 서열번호: 2에 따른 전장 아미노산 서열을 포함하는 예시적인 scFv를 지칭하며, 여기서 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)는 각각 서열번호 5 및 3에 따른 아미노산 서열을 갖는다.
- [0399] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 수치를 한정하기 위해 사용될 때 수치의 위와 아래로 최대 10%의 편차가 기재된 값의 의도된 의미 이내에 남아 있음을 나타낸다.
- [0400] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "VH" 또는 "V_H"는 항체의 중쇄 가변 영역을 지칭한다.
- [0401] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "VL" 또는 "V_L"은 항체의 경쇄 가변 영역을 지칭한다.
- [0402] 본원에 사용된 바와 같이, 참조 폴리펩티드 서열에 대한 용어 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)" 또는 "서열 동일성 퍼센트"는, 서열을 정렬하고, 필요한 경우 갭(gap)을 도입하여 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성한 후, 참조 폴리펩티드 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하려는 목적의 정렬은, 예를 들어 BLASTp, BLAST-2, ALIGN(예를 들어, ALIGN-2) 또는 메갈린(Megalign)(디엔에이스타(DNASTAR)) 소프트웨어와 같이 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계에 알려진 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 얻기 위해, 갭 BLAST는 문헌 [Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 활용될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 동일성 퍼센트는, 블로섬 62 매트릭스(Blossum 62 matrix) 또는 PAM250 매트릭스 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 웨이트(gap weight) 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 력스 웨이트(length weight)를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 통합되어 있는 문헌 [Needleman and Wunsch(*J. Mol. Biol.*(48):444-453(1970))]의 알고리즘을 이용해 결정될 수 있다.
- [0403] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 (이 용어가 사용되는 문맥에서 달리 제안하지 않는 한) 2개의 경쇄 폴리펩티드 및 2개의 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 일반적으로 지칭한다. 항체는 IgM, IgG, IgA, IgD 및 IgE 항체를 포함하는 상이한 항체 동종형을 포함한다. 용어 "항체"는, 비제한적으로 다클론성 항체, 단클론성 항체, 키메라화 또는 키메라 항체, 인간화 항체, 영장류화 항체, 탈면역화 항체 및 완전 인간 항체를 포함한다. 항체는, 임의의 다양한 종, 예를 들어 포유동물, 예컨대 인간, 비-인간 영장류(예를 들어, 오랑우탄, 개코원숭

이(baboon) 또는 침팬지), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 라마, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 저빌, 햄스터, 래트 및 마우스에서 제조되거나 이들로부터 유래될 수 있다. 항체는 정제된 항체 또는 재조합 항체일 수 있다.

[0404] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체 단편", "항원 결합 단편" 또는 유사한 용어는 표적 항원에 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 지칭한다. 상기 단편은, 비제한적으로 단일쇄 항체, 단일쇄 Fv 단편(scFv), Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 이 용어는 또한, 예를 들어 단일 도메인 항체, 예컨대 낙타과 (camelid)의 단일 도메인 항체를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Muylldermans 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 출원 공개 번호 WO 94/04678 및 WO 94/25591; 및 미국 특허 번호 6,005,079를 참조하고, 이들 모두 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원은 단일 도메인 항체가 형성되도록 변형을 갖는 2개의 VH 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공한다. 또한, 인트라바디, 미니바디, 트리아바디 및 디아바디가 항체 단편의 정의에 포함되며 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합하다. 예를 들어, 문헌 [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]을 참조하고, 이들 각각의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0405] 본원에 사용된 용어 바와 같이, 용어 "아미노산 치환" 또는 "치환된"(이러한 용어가 치환된 아미노산에 대해 지칭된 경우)은 사전결정된 아미노산 서열에서 적어도 하나의 기존 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 용어 "아미노산 삽입"은 적어도 하나의 추가 아미노산을 사전결정된 아미노산 서열로 혼입시키는 것을 지칭한다. 삽입은 일반적으로 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 삽입으로 이루어질 것이나, 더 큰 "펩티드 삽입"도 이루어질 수 있다. 대체되거나 삽입된 아미노산 잔기(들)는 자연 발생 또는 비-자연 발생(변형)일 수 있다. 용어 "아미노산 결실"은 사전결정된 아미노산 서열로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기의 제거를 지칭한다.

[0406] 본원에 사용된 바와 같이, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의되어 있고, 이는 다음을 포함한다:

[0407] (1) 소수성 측쇄: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu;

[0408] (2) 중성 친수성 측쇄: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0409] (3) 산성 측쇄: Asp, Glu;

[0410] (4) 염기성 측쇄: His, Lys, Arg;

[0411] (5) 측쇄 배향에 영향을 미치는 측쇄: Gly, Pro; 및

[0412] (6) 방향족 측쇄: Trp, Tyr, Phe.

[0413] 예를 들어, 비-보존적 아미노산 치환은 실질적으로 상이한 측쇄(즉, 상이한 패밀리의 구성원인 아미노산 잔기)를 갖는 아미노산 잔기로의 아미노산 잔기의 치환이다.

[0414] 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기의 소수성 지수(hydropathic index)를 고려함으로써 이루어진다. 각각의 아미노산에는 소수성 및 전하 특성에 근거한 소수성 지수가 할당된다. 이들은, Ile(+4.5); Val(+4.2); Leu(+3.8); Phe(+2.8); Cys(+2.5); Met(+1.9); Ala(+1.8); Gly(-0.4); Thr(-0.7); Ser(-0.8); Trp(-0.9); Tyr(-1.3); Pro(-1.6); His(-3.2); Glu(-3.5); Gln(-3.5); Asp(-3.5); Asn(-3.5); Lys(-3.9); 및 Arg(-4.5)이다. 폴리펩티드에 상호작용 기능을 부여함에 있어서 소수성 아미노산 지수의 중요성이 당업계에서 이해된다(예를 들어, Kyte et al(1982) *J Mol Biol* 157:105-131 참조). 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 동일한거나 유사한(예를 들어, 약 +2, +1.5, +1, +0.5, -0.5, -1, -1.5 또는 -2 이내) 소수성 지수를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로, 하나의 아미노산 잔기를 대체함으로써 이루어진다.

[0415] 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기의 친수성을 고려함으로써 이루어진다. 다음과 같은 친수성 값이 할당되어 있다: Arg(+3.0); Lys(+3.0±1); Asp(+3.0±1); Glut(+0.2); Gly(0); Thr(-0.4); Pro(-0.5±1); Ala(-0.5); His(-0.5); Cys(-1.0); Met(-1.3); Val(-1.5); Leu(-1.8); Ile(-1.8); Tyr(-2.3); Phe(-2.5); 및 Trp(-3.4). 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 동일한거나 유사한(예를 들어, 약 +2, +1.5, +1, +0.5, -0.5, -1, -1.5 또는 -2 이내) 친수성을 갖는 또 다른 아미노산 잔기로, 하나의 아미노산 잔기를 대체함으로써 이루어진다.

[0416] 예시적인 아미노산 치환이 표 2에 기재된다.

[0417] 표 2: 보존적 아미노산 치환

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
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 = 노르류신

Dbu = 2,4-디아미노부티르산

[0418]

[0419] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 항체"는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리되어 있는 항체를 지칭한다. 단리된 항체는 전형적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다. 단리된 항체는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없다(예를 들어, NMP1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 NMP1c:HLA-A2 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음).

[0420] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 핵산 분자"는 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리되어 있는 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산 분자는 이의 천연 염색체 위치와 상이한 위치에 존재한다.

[0421] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "네오에피토프"는 질환-특이적 돌연변이로부터 발생하는 펩티드를 포함하는 질환-특이적 항원을 지칭하고, 이는 자신과 상이하게 인식되고 질환에 의해 영향을 받는 세포의 표면 상에서 제시되지만, 정상 세포에서 그렇지 않다. "종양 네오에피토프" 또는 "암 네오에피토프"는 종양- 또는 암-특이적 돌연변이로부터 발생하는 펩티드를 포함하는 종양- 또는 암-특이적 항원을 지칭하고, 이는 자신과 상이하게 인식되고 종양/암 세포의 표면 상에서 제시되지만 정상 세포에서 그렇지 않다. 종양- 또는 암-특이적 네오에피토프의 제시는 종양 세포 내에서 종양- 또는 암-특이적 항원의 세포내 처리 및 절단 후에 발생하고, 이에 따라 종양- 또는 암-특이적 돌연변이를 포함하는 8-15개의 아미노산의 특정한 펩티드를 하나 이상 생성한다. 각각 CD8+ 또는 CD4+ T 세포에 대한 제시를 위해 MHC 클래스 I 또는 II 분자에 결합하는 이들 펩티드의 서브세트는 종양 네오에피토프를 구성한다.

[0422] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_D " 또는 " K_d " 또는 " K_d "는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가지며, 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 및 항원 간의 결합 반응의 평형 해리 상수를 지칭한다. K_D 의 값

은 항체 온-레이트(on-rate) 상수(k_{on})에 대한 항체 오프-레이트(off-rate) 상수(k_{off})의 비율의 수치적 표현이다. K_D 의 값은 항원에 대한 항체의 결합 친화도와 반비례 관계에 있다. K_D 값이 작을수록 이의 항원에 대한 항체의 친화도가 커진다. 친화도는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0423] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "koff" 또는 " k_{off} "는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가지며, 항체/항원 복합체로부터 항체의 해리에 대한 오프-레이트 상수를 지칭한다. koff의 값은 초당 붕괴 또는 해리되는 복합체의 일부의 수치적 표현이고, 단위 초⁻¹로 표현된다.

[0424] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "kon" 또는 " k_{on} "은 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가지며, 항원과 항체의 화합에 대한 온-레이트 상수를 지칭한다. kon의 값은 항체 및 항원의 1몰(1M) 용액 중 초당 형성되는 항체/항원 복합체의 개수의 수치적 표현이고, 단위 M⁻¹초⁻¹로 표현된다.

[0425] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합하다", "선택적 결합" 및 "선택적으로 결합하다"는 특정 항원 또는 에피토프(예를 들어, NPM1c:HLA-A2)에 대해 감지가능한(appreciable) 친화도를 나타내는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, 일반적으로 다른 항원 및 에피토프(예를 들어, HLA-A2 단독, 예를 들어, NPM1c 네오에피토프 단독, 예를 들어, HLA-A2와 복합체를 이루는 비-NPM1c 네오에피토프)에 결합하지 않거나, 실질적으로 결합하지 않는 것을 의미하도록 의도된다. "감지가능한" 또는 바람직한 결합은 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ 또는 10⁻¹⁰ M의 K_D 또는 이보다 더 우수한 K_D 로 결합하는 것을 포함한다. 항체 항원 상호작용의 K_D (친화도 상수)는 50%의 항체 및 항원 분자가 함께 결합된 항체의 농도를 나타낸다. 따라서, 적합한 고정 항원 농도에서, 더 높은(즉, 더 강한) 친화도 항체의 50%는, 더 낮은 친화도 항체와 동일한 결합 퍼센트를 달성하기 위해 요구될 것보다 더 낮은 항체 농도로 항원 분자에 결합할 것이다. 그러므로, 더 낮은 K_D 값은 더 높은(더 강한) 친화도를 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, "더 우수한" 친화도는 더 강한 친화도로서, 이는 이들의 비교 대상보다 수치 값이 더 낮은 것이며, 즉 10⁻⁷ M의 K_D 는, 10⁻⁶ M의 K_D 보다 수치 값이 더 낮은 것이고, 따라서 더 우수한 친화도를 나타낸다. 10⁻⁷ M, 바람직하게는 10⁻⁸ M보다 더 우수한 친화도(즉, K_D 값이 더 낮고 따라서 더 강함)가 일반적으로 바람직하다. 또한, 본원에 기재된 것의 중간 값이 고려되며, 바람직한 결합 친화도는 친화도의 범위로 표시될 수 있고, 예를 들어 본원에 개시된 NPM1c:HLA-A2에 결합하는 항체에 대한 바람직한 결합 친화도는 10⁻⁷ 내지 10⁻¹² M, 보다 바람직하게는 10⁻⁸ 내지 10⁻¹² M이다.

[0426] 항원에 "결합하지 않는" 또는 "실질적으로 결합하지 않는" 항체는 표적을 벗어난 항원(예를 들어, MHC 클래스 I 단백질 단독, 예를 들어 네오에피토프 단독, 예를 들어 MHC 클래스 I 단백질과 복합체를 이루는 대조군 펩티드)에 감지가능할 정도로 결합하지 않을 항체이다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, NPM1c:HLA-A2에 특이적으로 결합하는 항체는, 예를 들어, HLA-A2 단독, NPM1c 네오에피토프 단독 및/또는 HLA-A2와 복합체를 이루는 비-NPM1c 네오에피토프보다 NPM1c:HLA-A2에 대해 적어도 2 자릿수, 바람직하게는 3 또는 4 자릿수 이상의 더 우수한 결합 친화도(즉, 2, 3, 또는 4 자릿수 이상의 더 낮은 K_D 값을 나타내는 결합)를 나타낼 것이다. 특이적 또는 선택적 결합은, 예를 들어 스캐차드(Scatchard) 분석, 비아코어 분석, 생물층 간섭기 및/또는 경쟁적(경쟁) 결합 검정에 따른 것을 포함하여, 상기 결합을 결정하기 위한 임의의 당업계에 인정된 수단에 따라 결정될 수 있다.

[0427] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가지며, 그것이 연결되어 있는 또 다른 핵산 분자를 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 하나의 종류는 추가 DNA 세그먼트가 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 또 다른 종류는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포에 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능으로 작용하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아

데노-관련 바이러스)와 같은, 그러한 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

[0428] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "HLA-A"는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가지며, 인간 내에서 HLA-A 유전자좌에 의해 인코딩되는 인간 백혈구 항원(HLA)의 그룹을 지칭한다. HLA는 인간에 특이적인 주요 조직적합성 복합체(MHC) 항원이다. HLA-A는 인간 MHC 클래스 I 세포 표면 수용체의 세 가지 주요 종류 중 하나이다. 나머지는 HLA-B 및 HLA-C이다. HLA-A 단백질은 이중이량체이고, 중쇄 α 및 더 작은 β 쇠로 구성된다. α 쇠는 변이체 HLA-A 유전자에 의해 인코딩되고, β 쇠(β 2-마이크로글로불린)는 불변성(invariant) β 2 마이크로글로불린 분자이다. β 2 마이크로글로불린 단백질은 인간 게놈의 별도의 영역에 의해 코딩된다. HLA-A*02(A*02)는 HLA-A 혈청형(serotype) 그룹 내의 인간 백혈구 항원 혈청형이다. 혈청형은 HLA-A α -쇄의 α 2 도메인의 항체 인식에 의해 결정된다. A*02의 경우, α 쇠는 HLA-A*02 유전자에 의해 인코딩되고 β 쇠는 B2M 유전자좌에 의해 인코딩된다.

[0429] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효 투여량" 또는 "유효량"은 원하는 치료 효과를 달성하거나 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 양을 지칭한다.

[0430] 실시예

[0431] 대부분의 키메라 항원 수용체-T(CAR-T) 세포 요법은 종양-관련 항원(TAA)을 표적으로 삼으며, 이는 종양 세포에 의한 TAA 발현의 손실로 인한 종양 저항성 및 정상 조직에서의 낮은 수준 발현으로 인한 종양 표적 외 독성(on-target/off-tumor toxicity)으로 이어질 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 종양-특이적 발암성 동인 유전자 돌연변이로부터 생성된 세포내 신생항원으로부터 유래된 네오에피토프를 표적화하는 scFv는, 급성 골수성 백혈병(AML)의 ~35%에서 동인 암유전자 돌연변이인, 뉴클레오포스민 내의 4-뉴클레오티드 중복, 즉 NPM1c에서 동정되었다. NPM1의 돌연변이는 클론성이며 백혈병유발(leukemogenesis) 초기에 악성 형질전환에 필수적이다. 돌연변이는 가장 통상적인 HLA-A2 대립유전자에 의해 제시되는 네오에피토프를 생성한다. 구체적으로, NPM1c는 가장 통상적인 HLA-A*0201 대립유전자(인간 인구의 ~50%)에 의해 제시되는 백혈병-특이적 신생항원 에피토프(AIQDLCLAV(서열번호: 1), AIQ로 약칭됨)를 생성한다(Greiner *et al.*, *BLOOD* 120: 1282(2012) 참조).

[0432] AIQ 네오에피토프에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 갖는 NPM1c⁺ AML 환자가 네오에피토프에 대해 CD8 T 세포 반응이 없는 NPM1c⁺ AML 환자보다 극적으로 더 우수한 전반적인 생존을 가졌던 것으로 밝혀졌다(Greiner, J. *et al.*, *BLOOD* 122:1087 (2013)). 더욱이, 문헌 [Van der Lee *et al.*]은 HLA-A2에 의해 제시된 NPM1c 네오에피토프 CLAVEEVSL(서열번호: 72)을 인식하는 T 세포 수용체(TCR)를 동정하였고, 상기 TCR로 형질도입된 T 세포가 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ AML을 사멸시키는 데 효과적임을 보여주었다(van der Lee *et al.*, *J CLIN INVEST* 129: 774(2019) 참조). 그러나, 상기 요법의 결점은 외인성 및 내인성 TCR α 및 β 쇠 사이의 TCR 쇠 쌍오류(mispairing)의 위험이고, 이는 잠재적인 독성 및 감소된 효능을 초래한다(van der Lee *et al.*, *J CLIN INVEST* 129: 774(2019); Bendle *et al.*, *NAT MED* 16: 565, 1p(2010); van Loenen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10972(2010) 참조). TCR에 대한 또 다른 주요한 난제는 종양 항원에 대한 낮은 결합 친화도이다(Zhang. & Wang, *Technol Cancer Res Treat* 18 1078098716(2019) 참조).

[0433] 본원에 기재된 바와 같이, 일련의 양성 및 음성 선택 단계를 이용하는 효모 표면 디스플레이를 사용하여 NPM1c 에피토프-HLA-A2 복합체(즉, AIQ-HLA-A2)에 특이적으로 결합하지만 HLA-A2 단독, 또는 대조군 펩티드 또는 다른 항원성 펩티드가 로딩된 HLA-A2(예를 들어, 암-고환 항원 NY-ESO-1 에피토프 SLLMWITQC(서열번호: 62)가 로딩된 HLA-A2, 또는 SLL-HLA-A2, 예를 들어 인플루엔자 바이러스 M1 에피토프 GILGFVFTL(서열번호: 63)이 로딩된 HLA-A2 또는 GIL-HLA-A2)에 대해 그렇지 않은 인간 scFv를 동정하였다. 또한, AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 단리된 scFv의 친화도는 약 7 nM인 것으로 결정되었고, 이는 이의 동족 펩티드-MHC 복합체에 대한 전형적인 TCR의 친화도보다 10-100배 더 높은 것이다. 단리된 scFv를 발현하는 조작된 CAR-T 세포는 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 백혈병 세포에 대해 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 강력한 세포독성을 나타내지만, NPM1c⁻ HLA-A2⁺ 백혈병 세포 또는 HLA-A2⁻ 종양 세포에 대해서는 그렇지 않은 것이 확인되었다. 본원에 기재된 결과는 NPM1c CAR-T 세포가 잠재적으로 감소된 종양 표적 외 독성 및 종양 저항성을 갖는 AML과 같은 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 암을 치료하기 위한 암-특이적 면역요법으로서 유용하다는 것을 보여준다.

[0434] 본원에 기재된 바와 같이, scFv("YG1"으로 지칭됨)는, HLA-A2와 특이적으로 그리고 높은 친화도(약 7 nM)로 복합체를 이루는 NPM1c 네오에피토프(AIQDLCLAV; 서열번호: 1)에 결합하는 것으로 나타났다. HLA-A2와 복합체를

이루는 NPM1c 네오에피토프(AIQDLCLAV; 서열번호: 1)에 특이적으로 결합하는 YG1 scFv(NPM1c CAR)를 포함하는 CAR 폴리펩티드를 생성하였고, NPM1c CAR 폴리펩티드를 발현하는 T 세포(특히, CD8⁺ T 세포)는, AML 마우스 모델(AML 종양 세포 주입)에서, *시험관내* AML 세포를 특이적으로 사멸하고, *생체내* 생존율을 연장하고 백혈병 부담을 감소시킨다. 구체적으로, YG1 scFv를 발현하는 조작된 CAR-T 세포는 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 백혈병 세포 및 원발성(primary) AML 아세포에 대해 *시험관내* 및 *생체내* 둘 모두에서 강력한 세포독성을 나타내지만 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 백혈병 세포 또는 HLA-A2⁺ 종양 세포에 대해서는 그렇지 않다.

[0435] 따라서, NPM1c CAR-T 세포는 종양 세포 집단의 이질성(heterogeneity)에 상관없이 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ 백혈병 세포를 특이적으로 표적화하여, 종양 저항성의 발달을 감소시킬 것으로 예상된다. 더욱이, 건강한 조직에서 NPM1c 발현이 부재하기 때문에, NPM1c CAR-T는 종양 표적 외 독성이 없거나 최소인 항종양 면역을 매개할 것으로 예상된다. 실제로, YG1 scFv를 발현하는 조작된 CAR-T 세포는 CD34⁺ 정상 조혈 줄기/전구 세포에 반응하지 않는 것으로 확인되었다.

[0436] 또한, TCR 및 통상적인 CAR 접근법과 비교하여, scFv 표적화 펩티드-HLA 복합체는 NK 세포를 무장시키는 독특한 이점을 가질 것으로 예상된다. NK 세포는 보통 HLA 발현을 갖지 않거나 낮은 HLA 발현을 갖는 표적 세포를 인식하고 사멸시킨다(Vivier *et al.*, *SCIENCE* 331: 44(2011)). 이론에 얽매이지 않고, HLA 발현이 없거나 낮은 수준의 HLA 분자를 갖는 백혈병 세포는 NK 세포뿐만 아니라 HLA를 높은 수준으로 발현하는 그러한 백혈병 세포에 의해 우선적으로 사멸될 수 있으며, 따라서 더 많은 AIQ-HLA-A2 표적이 NPM1c CAR-NK 세포에 의해 효율적으로 사멸된다. 항원 소실은 CAR-T 요법(Shah & Fry, *NAT REV CLIN ONCOL* 16: 372(2019)) 후, 종양 저항성의 중요한 메커니즘인 바, NPM1c CAR-NK 세포는 요법 및 질환 재발에 대한 저항성을 감소시키는 데 특히 효과적일 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 결과에 기초할 때, 유도 전분화능 줄기 세포(iPSC)는 NK 세포로 분화되어(Hermanson, *et al.*, *STEM CELLS* 34: 93(2016) 참조), 항원 면역요법을 위한 임상 규모에서 표준화되고 표적화된 "표준 양산(off-the-shelf)" 림프구를 제공할 수 있다(Li *et al.*, *CELL STEM CELL* 23: 181(2018) 참조). 따라서, 본원은 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ 암 환자(예를 들어, HLA-A2⁺ NPM1c⁺ AML 환자)에서 항-백혈병 효능을 개선하기 위해 NPM1c CAR을 NK 세포에 혼입시키는 것도 고려한다.

[0437] **약어**

[0438] AIQ, AIQDLCLAV(서열번호: 1); AML, 급성 골수성 백혈병; alloSCT, 동종이계 조혈모세포 이식; BLI, 생물발광 영상화; CAR, 키메라 항원 수용체; CAR-T, 키메라 항원 수용체 T 세포; FACS, 형광-활성화 세포 분류; FBS, 소 태아 혈청; GIL, GILGFVFTL(서열번호: 63); HSC, 조혈모세포; MACS, 자기-활성화 세포 분류; NPM1, 뉴클레오포스민; NPM1c, 돌연변이체 뉴클레오포스민; scFv, 단일-쇄 가변 단편; SLL, SLLMWITQC(서열번호: 62); TAA, 종양-관련 항원; TCR, T-세포 수용체; HSPC, 조혈 줄기/전구 세포.

[0439] **실시예 1-7에 사용된 물질 및 방법**

[0440] **펩티드-HLA-A2 복합체의 제조**

[0441] 돌연변이체 NPM1c 유래의 CD8 T-세포 에피토프 펩티드(AIQDLCLAV(서열번호: 1); AIQ로 약칭됨) 및 암-고환 항원 NY-ESO-1(SLLMWITQC(서열번호: 62), SLL로 약칭됨) 유래의 대조군 펩티드 및 인플루엔자 바이러스 M1 단백질(GILGFVFTL(서열번호: 63), GIL로 약칭됨)을, 젠스크립트(Genscript)에 의해 합성하고 정제하였다. 제조한 인간 HLA-A2:Ig 융합 단백질(이량체 I)을 BD 바이오사이언스(BD Biosciences)로부터 수득하였다. 펩티드-HLA-A2 복합체를 제조업체의 프로토콜에 따라 제조하였다. 간략하게는, 펩티드를 640:1의 몰비로 HLA-A2:Ig 융합 단백질과 혼합하였고, 혼합물을 37°C에서 밤새 항온처리하여 자발적인 복합체 어셈블링을 가능하게 하였다. 펩티드-HLA-A2로 지칭되는, 펩티드-로딩된 HLA-A2:Ig 융합 단백질을 4°C에서 최대 1주 보관하였다.

[0442] **효모 배지 제형**

[0443] SDCAA 배지: 20 g 텍스트로스, 6.7 g 디프코(Difco) 효모 질소 염기, 5 g 박토(Bacto) 카사미노산, 10.2 g Na₂HPO₄·7H₂O 및 8.56 g NaH₂PO₄·H₂O를 부피 1 리터로 탈이온화된 H₂O에 용해시키고, 0.2 μm 여과 유닛을 사용하여 멸균 여과하였다.

[0444] SGCAA 배지: 20 g 갈락토스, 6.7 g 디프코 효모 질소 염기, 5 g 박토 카사미노산, 10.2 g Na₂HPO₄·7H₂O 및 8.56

g NaH₂PO₄·H₂O를 부피 1 리터로 탈이온화된 H₂O에 용해시키고, 0.2 μm 여과 유닛을 사용하여 멸균 여과하였다.

[0445] SDCAA 플레이트: 10.2 g Na₂HPO₄·7H₂O 및 8.56 g NaH₂PO₄·H₂O, 182 g 소르비톨 및 15 g 박토 한천을 부피 900 ml로 탈이온화된 H₂O에 용해시키고, 오토클레이브(autoclave)하였다. 별도의 비이커에서, 20 g 텍스트로스, 6.7 g 디프코 효모 질소 염기 및 5 g 박토 카사미노산을 부피 100 ml로 탈이온화된 H₂O에 용해시키고, 여과에 의해 멸균시켰다. 오토클레이브된 혼합물을 50 1C 미만까지 교반하면서 냉각시키고, 여과-멸균된 용액과 합하고, 혼합하고 플레이트에 부었다.

[0446] SG-2 x SCAA 배지: SG(6.7 g 디프코 효모 질소 염기, 20 g 갈락토스, 10.2 g Na₂HPO₄·7H₂O 및 8.56 g NaH₂PO₄·H₂O), 190 mg Arg, 400 mg Asp, 1,260 mg Glu, 130 mg Gly, 140 mg His, 290 mg Ile, 400 mg Leu, 440 mg Lys, 108 mg Met, 200 mg Phe, 220 mg Thr, 52 mg Tyr, 380 mg Val 및 1 g BSA를 부피 1 리터로 탈이온화된 H₂O에 용해시키고, 여과에 의해 멸균시켰다.

[0447] **세포주 배양**

[0448] OCI-AML3, T2 및 PC-3 세포를 ATCC로부터 구입하였다. OCI-AML2 세포를 DSMZ로부터 구입하였다. OCI-AML3 세포 및 OCI-AML2를 10% FBS(라이프 테크(Life Tech) 및 VWR) 및 2 mM L-글루타민(펩티드 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))이 보충된 RPMI 1640 배지(집코(Gibco))에서 배양하였다. 이전에 기재된 바와 같이 암유전자 c-Myc 및 Bcl2로 형질도입된 인간 조혈모세포(HSC)를 면역결핍 마우스에 이식함으로써 GMB 세포를 생성하였다(Leskov *et al.*, *ONCOGENE* 32: 1066 (2013); Pallasch *et al.*, *CELL* 156: 590 (2014) 참조). GMB 세포를 110 mg/L 피루이트 나트륨, 1 x 비필수 아미노산, 1 x 2-머캅토에탄올 및 10% FBS로 보충된 DMEM 배지(집코)에서 배양하였다. T2 세포(174 x CEM.T2)(ATCC® CRL-1992™)를 20% FBS로 보충된 IMDM 배지(집코)에서 배양하였다. PC-3 세포를 10% FBS로 보충된 F-12K 배지(ATCC)로 배양하였다. 모든 배지에 1% v/v 페니실린-스트렙토마이신 용액(라이프 테크놀로지)을 보충하였다.

[0449] **AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 인간 scFv의 단리**

[0450] AIQ-HLA-A2 복합체를 인식하는 인간 scFv를, 이전에 기재된 바와 같이, 자기-활성화 세포 분류 선택(MACS) 후, 형광-활성화 세포 분류(FACS, 아리아(Aria) 2)를 이용하는 선택을 이용하여 효모 표면에 디스플레이된 비면역 인간 scFv 라이브러리로부터 단리하였다(Chao *et al.*, *NAT PROTOC* 1: 755(2006) 참조). AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 scFv를 풍부하게 하기 위해, SLL-HLA-A2 복합체 및 HLA-A2 단백질을 음성 선택에 사용하였다. AIQ-HLA-A2, SLL-HLA-A2 및 HLA-A2를 선택의 각 라운드 전에 비오틴화시켰다. 각각의 라운드로부터 선택된 효모 풀(pool)을 SDCAA 배지에서 밤새 증식시킨 후, SGCAA 배지에서 scFv를 발현하도록 유도하였다. 후속 선택 라운드를 위해 사용된 유도 효모 세포의 개수는 이전 선택 라운드로부터 선택된 효모 세포 개수의 약 10배였다. AIQ-HLA-A2 복합체를 인식하는 scFv의 단리를 위한 전략은 도 1a 및 도 1b에 도시된다. AIQ-HLA-A2를 이용한 양성 선택에 이어서 SLL-HLA-A2를 이용한 음성 선택을 포함하는 MACS 선택의 두 라운드 후, 선택된 효모 풀을 복수라운드의 FACS 선택 받게 하였다(도 1b). FACS 선택의 각각의 라운드 동안, 선택된 효모 세포 풀을 HLA-A2, GIL-HLA-A2, SLL-HLA-A2 및 AIQ-HLA-A2에 대한 결합에 대해 유세포 분석에 의해 검정하였다(도 1c).

[0451] **선택된 효모 세포로부터 플라스미드 DNA의 단리 및 scFv의 서열분석**

[0452] 선택된 효모 세포 집단 유래의 플라스미드 DNA를 제조업체의 지침에 따라 자이모프레프(Zymoprep) 키트(자이모리서치(Zymo Research))를 사용하여 단리하였다. 플라스미드 단리를 위해 사용된 효모 세포의 개수는, 선택된 개체군에서 각각 다른 효모 클론으로부터 디스플레이 플라스미드를 수득하도록, 예상된 개체군 다양성보다 적어도 10배 더 높았다(Chao *et al.*, *NAT PROTOC* 1: 755(2006) 참조). 알파-선택 골드 *E. coli* (Gold *E. coli*) 컴피턴트 세포(competent cell)(바이올라인(Bioline))를 5 μL의 플라스미드 DNA로 형질전환하고, LB 앰프(Amp) 플레이트 위로 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 25개의 단일 콜로니를 무작위로 선정하고, LB 앰프 배지에 접종하고, 200 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 그 후, 플라스미드 DNA를 미니프랩(키아젠(QIAGEN))에 의해 이들 25개 배양물로부터 제조하였고, scFv를 다음과 같은 프라이머를 사용하여 서열분석하였다: 정방향, 5'-GTCAGTAATTGCGGTCTCACC-3'(서열번호: 64) 및 역방향, 5'-GTACAGTGGGAACAAAGTCG-3'(서열번호: 65).

[0453] **scFv 클론의 특징화**

[0454] RJY100 컴피턴트 효모 세포를 동결-EZ 효모 형질전환 II 키트(자이모 리서치)를 사용하여 제조하였다. 관심 단일 scFv 클론에 대한 디스플레이 플라스미드를 제조업체의 프로토콜에 따라 컴피턴트 효모 세포로 형질전환시켰다. SDCAA 플레이트에 형질전환된 효모 세포를 플레이팅하고 가시적인 콜로니를 형성할 때까지 30℃에서 2일 초과 동안 항온처리함으로써 단일 클론을 수득하였다. 3-5개의 클론을 무작위로 선택하고, 5 mL SDCAA 배양물에 별도로 접종하고, 250 rpm으로 밤새 진탕하면서 30℃에서 성장시켰다. 효모 표면에서 scFv 발현을 유도하기 위해, SDCAA 배양물로부터 5×10^7 개의 효모 세포를 5 mL SGCAA 배지에 접종하고, 적어도 20시간 동안 250 rpm으로 진탕하면서 20℃에서 유도하였다. 생성된 효모 세포를 비오틴-표지된 HLA-A2, GIL-HLA-A2, SLL-HLA-A2 또는 AIQ-HLA-A2와 함께 항온처리한 후, 스트렙타비딘-APC(바이올레전드(BioLegend)) 및 FITC-표지된 항-c-Myc 항체(아브캄(Abcam))로 암실에서 20분 동안 얼음 위에서 염색하였다. 염색된 효모 세포를 유세포 분석(LSR II HTS-1)에 의해 분석하여 샘플당 적어도 20,000가지의 사례를 수집하였다.

[0455] **가용성 scFv-Fc 단백질의 발현**

[0456] 가용성 scFv-Fc 단백질을 전환가능한 효모 디스플레이/분비 시스템을 사용하여 제조하였다(Van Deventer et al., *PROTEIN ENG DES SEL* 28: 317 (2015) 참조). ScFv DNA를 합성하고(인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지(Integrated DNA Technologies, IDT)) 및 Fc 단편을 Q5 하이-피델리티 2x마스터믹스(Q5 High-Fidelity 2xMaster Mix)(NEB)를 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 프라이머는 5'-CCGGGGTAGAACCTAAAAGTTCCG-3'(서열번호: 66)(정방향) 및 5'-TTTGTCTGCACGCGTGGATC-3'(서열번호: 67)(역방향)이었다. 전환가능한 효모 디스플레이/분비 벡터 백본 pCHA-FcSup-TAG를 효소 NheI 및 BamHI를 이용해 이중으로 분해처리(digest)하였다. 겔 정제 후, 벡터 백본, scFv DNA 및 Fc DNA 단편을 제조업체의 프로토콜에 따라, 김슨 어셈블리 마스터 믹스(Gibson Assembly Master Mix)(뉴 잉글랜드 바이오랩(New England BioLabs), NEB)를 사용하여 어셈블링하였다. 2 μ L의 어셈블링 반응 혼합물을 알파-선택 골드 *i*. 콜리 컴피턴트 세포(바이올라인)으로 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 37℃에서 60분 동안 진탕(200 rpm)한 후, LB 암피실린 플레이트에 플레이팅하였다. 콜로니를 선정하고, 플라스미드 추출을 위해 암피실린을 함유하는 액체 LB 배지에서 성장시켰다. 생성 플라스미드를 서열분석하였고, 서열분석 프라이머는 5'-GGGTAATTAATCAGCGAAGCGATG-3'(서열번호: 68)(정방향) 및 5'-GTACAGTGGGAACAAAGTCG-3'(서열번호: 65)(역방향)이었다. 올바른 플라스미드를 RJY100 컴피턴트 효모 세포로 형질전환시켰다. 형질전환된 효모 세포를 SD-SCAA 배지에서 30℃에서 포화까지 성장시키고 밤새 250 rpm으로 진탕하였다. 포화된 배양물을 펠렛화하고 200 mL SG-2 x SCAA 유도 배지에서 1.0의 OD₆₀₀까지 재현탁하였다. 그 후, 재현탁된 배양물을 250 rpm으로 진탕하면서 20℃에서 4일 동안 성장시켰다. 효모 세포를 15분 동안 10,000 x g으로 펠렛화하고, 상청액을 0.2 μ M 필터(폴 코포레이션(Pall Corporation))를 사용하여 여과하였다. 여과액의 pH를 1 x의 최종 농도까지 10 x PBS, pH 7.4(김코)를 이용해 pH 7.4로 조정하였다. ScFv-Fc를 제조업체의 프로토콜에 따라 1 mL 수지(젠스크립트)를 함유하는 사전-평형화된 단백질 A 컬럼을 통해 여액을 두 번 통과시킴으로써 정제하였다. SDS-PAGE에 의해 수지에 대한 결합 효율을 측정하기 위해 유동 통과 매질을 수집하였다. 결합된 scFv-Fc를 갖는 수지를 10 mL 결합/세척 완충액을 사용하여 3회 세척하였다. ScFv-Fc를 10 mL 용리 완충액을 사용하여 수지로부터 용리시켰다. scFv-Fc를 함유하는 용출물을 중화 완충액(총 용출물의 1/10 부피)으로 pH 7.4로 즉시 중화시켰다. 중화된 용출물을 농축하고 원심 여과 유닛(밀리포어(Millipore) 30 kDa 분자량 컷-오프)을 사용하여 완충액을 1 x PBS로 교환하였다. ScFv-Fc를 나노드롭(Nanodrop) 분광 광도계(서모 사이언티픽(Thermo Scientific))에서 A280 측정에 의해 정량화하였고, 순도를 5% 스택킹 겔(stack gel) 및 6% 분리 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 평가하였다. 5 nM 단백질을 사용하여, 실온에서 30분 동안 200 μ L PBS 완충액에서 5×10^5 개의 표적 세포와 함께 항온처리한 후, PE-표지된 항-HA-태그 항체로 염색하여 유세포 분석에 의해 표적 세포 표면 상의 AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 정제된 scFv-Fc 단백질의 특이적 결합을 평가하였다.

[0457] **생물층 간섭기에 의한 ScFv-Fc 친화도 결정**

[0458] 생물층 간섭기 실험을 옥테트 레드96 기기(포르테바이오 주식회사)를 사용하여 25℃에서 수행하였다. 모든 단계에 사용된 동일한 완충액은 0.05% 트윈 20 및 0.1% BSA를 갖는 결합 완충액을 포함하였다. scFv-Fc 용합 단백질을 EZ-링크-NHS-PEG4-비오틴(서모 사이언티픽)을 사용하여 비오틴화하였다. 스트렙타비딘-코팅된 바이오센서(스트렙타비딘 딥 앤 리드 바이오센서(Dip and Read Biosensors), 포르테바이오)에 모든 센서(기준 제외)가 포획 임계값 0.5 nm에 도달할 때까지 200 μ L 부피의 20 μ g/mL 비오틴화된 scFv-Fc 단백질을 로딩하였다. 완충액 단독에서 60초 행균 및 기준선 단계 후, 센서를 항원(AIQ-HLA-A2 복합체, SLL-HLA-A2 복합체 또는 HLA-A2)의 1:2 희석 시리즈(0 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM 및 80 nM)에 노출시켰다. 항원과의 화합을 1,000초 동안 모니터링하고 해리를 완충액 단독에서 1,500초 동안 수행하였다. 데이터 분석을 포르테바이오 데이터 아날리

시스 8.2(ForteBio Data Analysis 8.2)(포르테바이오)를 사용하여 수행하였다. 데이터 세트를 1:1 결합 모델로 맞추화하여, K_{on} , K_{off} 및 K_D 를 결정하였다.

[0459] **CAR 벡터 디자인**

[0460] YG1 또는 CD19 scFv, CD8 α 선도 서열, 세포외 힌지 도메인 및 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극 도메인 및 CD3 제타 활성화 도메인으로 구성된 CAR의 서열을 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지(IDT)에 의해 맞춤 합성하였다. 자가절단 P2A에 이어서 EGFP(P2A-GFP)로 구성된 제2 단편을 동일한 방법에 의해 합성하였다. pHIV 벡터(플라스미드 #21373)를 효소 XbaI 및 ClaI로 이중으로 분해처리하였다. 벡터 백본의 겔 정제 후, pHIV 백본, CAR 단편 및 P2A-GFP 단편을 제조업체의 프로토콜에 따라 HiFi DNA 어셈블리 마스터 믹스(뉴 잉글랜드 바이오랩)를 사용하여 5' 및 3' 말단의 중첩 영역을 기반으로 어셈블링하였다. 생성된 플라스미드를 다음과 같은 서열분석 프라이머를 사용하여 서열분석하였다: 5'-GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT-3'(서열번호: 69)(정방향) 및 5'-AGGCACAATCAGATTGGTAGCTG-3'(서열번호: 70)(역방향). 올바른 서열을 가진 플라스미드를 pHIV-CAR-GFP로 명명하였다.

[0461] **CAR-발현 1차 인간 T 세포의 생성**

[0462] 293T 세포를 pHIV-CAR-GFP, pCMV-VSVG, pCMV- Δ 8.9 및 pAdv 플라스미드로 형질감염시킴으로써 렌티바이러스를 생성하였다. 배양 상청액을 48시간 및 72시간에 수집하고, 렌티바이러스 입자를 2시간 동안 25,000 rpm, 4°C에서 초원심분리함으로써 펠렛화하였다. 렌티바이러스 입자를 100 μ L의 무혈청 DMEM 배지에 현탁시키고 -80°C에서 동결시켰다. 인간 CD8 $^{+}$ T 세포를 이지셉TM 인간 CD8 $^{+}$ T 세포 단리 키트(줄기 세포)를 사용하여 HLA-A2 $^{+}$ 공여자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리하였다. 단리된 T 세포의 순도(>95%)를 CD3 및 CD8 염색과 함께 FACS를 사용하여 정량화하였다. CD8 $^{+}$ T 세포를 T 세포 트랜스액트(TransAct)TM(밀테니(Miltenyi))를 사용하여 활성화 및 확장시켰고, 50 IU/mL IL-2(밀테니), 3% 소 태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(라이프 테크놀로지)이 보충된 TexMACS 배지(밀테니)에서 배양하였다. T 세포를 트랜스액트TM 자극 4일 후에 렌티바이러스(MOI=10)로 형질도입시켰다. GFP $^{+}$ CAR-T 세포를 FACS에 의해 정제하였고, T 세포에 대한 CAR 발현을, 알렉사 플루오르® 647 아피니퓨어(AffiniPure) F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG(H+L)(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))를 사용하여 결정하였다. CAR-T 세포를 10 ng/mL 재조합 인간 IL-7(펩로테크(Peprotech)), 5 ng/mL 재조합 인간 IL-15(펩로테크), 3% 소 태아 혈청(FBS) 및 1% v/v 페니실린-스트렙토마이신 용액(라이프 테크놀로지)이 보충된 TexMACS 배지(밀테니)에서 사용 전 10일 동안 확장시켰다.

[0463] **시험관내 CAR-T 세포의 세포독성**

[0464] 표적 세포를 사멸시키는 CAR-T 세포의 능력을 평가하기 위해, CD8 $^{+}$ CAR-T 세포를 표시된 이펙터:표적 비율로 표적 세포와 함께 항온처리하였다. 세포를 혼합한 직후(0시간)와 항온처리 24시간 후, 세포를 혈청이 없이 PBS에서 세척하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 생/사 고정형 죽은 세포 염색 키트(Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit)(인비트로젠(Invitrogen))를 사용하여 염색하였다. 그 후, 세포를 FITC-항-인간 CD8, PE-항 인간 CD33 또는 PE-항 인간 CD19 항체로 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 유세포 분석(LSRII HTS-1)에 의해 분석하였다. 각각의 샘플의 특이적 용해를 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다: 용해(%) = {1 - [CAR-T 그룹에서 (24시간에서 표적 세포 % / 0시간에서 표적 세포 %) / 형질도입되지 않은 T 그룹에서 (24시간에서 표적 세포 % / 0시간에서 표적 세포 %)]} X 100.

[0465] **세포내 사이토카인 염색**

[0466] CAR 형질도입되거나 형질도입되지 않은 인간 CD8 $^{+}$ T 세포를, 어떠한 사이토카인도 없이, 37°C, 5% CO₂에서 12 시간 동안, 단백질 수송 억제제 모넨신(BD 바이오사이언스) 및 브레펠딘 A(바이오레전드)의 존재 하에, 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640의 96-웰 등근 바닥 플레이트 내 2 x 10⁶ 세포/mL에서 1:1 비율로 표적 세포와 공동-배양하였다. 세포를 세척하고 생/사 고정형 아쿠아 죽은 세포 염색(Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain)으로 염색한 후, CD3에 대해 표면 염색하고, 이어서 고정하고, 막투과하고, 항-IFN- γ -APC-Cy7(바이오레전드) 및 항-IL-2-APC(바이오레전드)로 세포내 염색하였다. 세포를 유세포 분석(LSR 포르테사(Fortessa) HTS-2)에 의해 분석하고 살아있는 CD3 $^{+}$ 림프구를 추가 분석하기 위해 게이팅하였다.

[0467] **생체내 표적 세포의 CAR-T 세포 사멸**

[0468] NOD-scid IL2rg^{tm1} (NSG) 마우스를 켄스 래보레이토리(Jackson Laboratories)로부터 구입하였고, 매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지(Massachusetts Institute of Technology, MIT)에서 특정 병원체-미포함(SPF) 사육장에 수용하였다. 마우스를 이용한 모든 실험은 실험동물윤영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다. 간략하게는, 루시페라제-발현 OCI-AML3 세포(1×10^6), GMB 세포(2×10^6) 또는 OCI-AML2 세포(1×10^6)를 200 μ L의 PBS에서, 꼬리 정맥 주사에 의해 NSG 마우스에 주사하였다. 4일 후, GFP 발현을 기준으로 분류된 1×10^7 개의 CAR-T 세포 또는 활성화되었지만 형질도입되지 않은 인간 T 세포를 종양-보유 마우스에 주사하였다. 제노겐(Xenogen) IVIS-200 스펙트럼 카메라를 사용하여 3일마다 생물발광 영상화(BLI)를 수행하였다.

[0469] 유세포 분석에 의해 T 세포 및 종양 세포를 분석하기 위해, T 세포 주사 18일 후, 혈액, 비장, 골수 및 간을 수확하였다. 약 200 μ L의 혈액을 심장-천자에 의해 4 mM EDTA와 PBS 1 ml를 함유하는 미세원심분리 튜브 내로 수집하였다. 세포를 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하고, 혼합물을 위아래로 조심스럽게 피펫팅함으로써 1 mL의 ACK 용해 완충액(론자 바이오사이언스(Lonza Bioscience))으로 재현탁하고, 실온에서 5분 동안 유지하였다. 세포를 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리한 후, FACS 완충액에 재현탁하였다. 장기를 수확하기 전에, 간을 상장간막 정맥(superior mesenteric vein)을 통해 5 mL의 PBS로 관류하였다. 비장과 간을 주사기 플런저를 사용하여 70 μ m 스트레이너를 통해 가압함으로써 기계적으로 파괴하였다. 파괴된 간을 2 mg/mL 콜라게나제 D(시그마-알드리치, 미국)로 37°C에서 30분 동안 분해처리하였다. 5 mL의 차가운 PBS로 플러싱함으로써 양측 대퇴골로부터 골수 세포를 수집하였다. 단일-세포 현탁액을 제조하고 적혈구를 용해시켰다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 1,500 rpm으로, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고, FACS 완충액으로 재현탁하고, 트립판 블루(trypan blue) 염색으로 계수하였다.

[0470] 유세포 분석을 위해, 5백만 개의 세포를 분취하고, 20 μ L의 인간 혈청과 혼합하여 5분 동안 Fc 수용체를 차단하였다. 그 후, 세포를 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 다음과 같은 접합 항체로 염색하였다: 항-mCD45.1-BUV737(BD 바이오사이언스), 항-hCD45-APC-Cy7(바이오레전드), 항-hCD8-PE(바이오레전드), 항-CD33-APC(바이오레전드), 항-hPD1-PE-Cy7(바이오레전드) 및 항-Tim-3-BV711(바이오레전드). 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, DAPI를 함유하는 FACS 완충액에 재현탁시켰다. LSR 포르테사 HTS-2 유세포 분석기(BD 바이오사이언스)를 사용하여 유세포 분석을 수행하여 샘플당 100,000가지 사례를 수집하였다.

[0471] **통계적 분석**

[0472] 달리 명시되지 않는 한, 적어도 3회의 독립적인 실험으로부터의 평균 $\pm$ 표준오차로서 데이터를 나타낸다. 양측 t-테스트(two-tailed t-test)를 이용하여 두 개의 독립적인 그룹을 비교하였다. 생체내 종양 성장을 양방향 반복 측정 ANOVA를 사용하여 비교하였다. 카플란 마이어 방법을 이용하여 종양-보유 마우스의 생존 패턴을 분석하였고, 만텔-콕스(Mantel-Cox) 로그 순위 테스트에 따라 통계적 차이를 평가하였다. p 값 < 0.05 를 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석을 SPSS 스태티스틱스(Statistics) 22 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0473] **루시페라제 활성 측정에 의한 세포독성 검정**

[0474] CAR-T 세포의 세포독성 검정을 루시페라제-발현 표적 세포주를 사용하여 수행하였다. T 세포를 24시간 동안 표시된 이펙터:표적(E:T) 비율로 표적 세포와 함께 항온처리하였다. 그 후, 세포를 PBS에서 1회 행구고, 루시페라제 세포 배양 용해 시약(프로메가(Promega))에 용해한 후, 루시페라제 검정 시약(프로메가)와 혼합하였다. 플레이트 분광광도계(인피니트(Infinite) M200PRO, 테칸(TECAN))을 사용하여 용해물의 발광성을 분석하였다. 표적 세포 단독의 발광성을 기준선 대조군으로 사용하였다. 각각의 샘플의 특이적 용해를 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다: 특이적 용해(%) = $100 \times \{1 - [(CAR-T \text{ 그룹의 발광성} / \text{표적 세포 단독의 발광성}) / (\text{형질도입되지 않은 T 그룹의 발광성} / \text{표적 세포 단독의 발광성})]\}$.

[0475] **쿠안티바디 인간 사이토카인 검정**

[0476] 쿠안티바디 인간 사이토카인 어레이 1(QAH-CYT-1)을 레이비오테크(Raybiotech)로부터 구입하였다. 하나의 유리 슬라이드를 동일한 사이토카인 항체 어레이의 16개 웰로 스팟팅(spotting)하였다. 각각의 웰은 20개의 인간 사이토카인에 대한 4회 거듭한 항체 스팟을 함유하였다. 4명의 건강한 공여자로부터 유래된 2×10^5 개의 NPM1c

CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포를, 37℃, 5% CO₂에서 16 시간 동안, 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 어떠한 사이토카인도 없이, 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640에서 1×10^5 개의 NPM1c⁺HLA-A2⁺ OCI-AML3 세포와 함께 공동-배양한 후, 사이토카인 정량을 위해 각각의 웰로부터 100 μ l의 무세포 상청액을 수집하였다. 어레이 슬라이드를 제조업체 지침에 따라 처리 및 가공하였다. 표준 곡선을 계산하기 위해 일부 슬라이드 웰을 순수 항원으로 처리하였다. 형광 신호를 레이저 스캐너(엑손 제네피스(Axon GenePix))에 의해 검출하였다. 데이터 추출을 마이크로어레이 분석 소프트웨어(제네피스)와 함께 이러한 어레이에 대해 특이적인 GAL 파일(www.RayBiotech.com/Gal-Files.html)을 사용하여 수행하였고, 스콧으로부터 F488 총 강도를 ELISA 계산 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각각의 사이토카인의 알려진 농도의 표준 곡선을 확립하였고, 표준 곡선에 대한 보간법에 의해 샘플 내 사이토카인 농도를 계산하였다.

[0477] **정밀 계수 비드와 유세포 분석에 의한 세포독성 검증**

[0478] 환자-유래 원발성 AML 샘플을 다나-파버 캔서 인스티튜트(Dana-Farber Cancer Institute)로부터 구입하였다. NPM1c CAR-T 세포를 표시된 이펙터:표적 비율로 원발성 AML 세포와 함께 항온처리하였다. 항온처리 24시간 후, 세포를 혈청없이 PBS에서 세척하고 제조업체의 프로토콜에 따라 생/사 고정형 죽은 세포 염색 키트(인비트로젠)를 사용하여 염색하였다. 그 후, 세포를 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 FITC-항-인간 CD8, PE-항-인간 CD33으로 염색하였다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 180 μ l의 FACS 완충액으로 재현탁시킨 후, 20 μ l의 정밀 계수 비드(바이오레전드)를 제조업체 지침에 따라, 총 부피 200 μ l까지 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포를 유세포 분석(LSR II HTS-1)에 의해 분석하였다. 원발성 AML 세포의 절대 세포 수를 제조업체 지침의 공식에 따라 계산하였다. 각각의 샘플의 특이적 용해를 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다: 특이적 용해(%) = $100 \times [1 - (\text{CAR-T 그룹의 원발성 AML 세포의 절대 세포 수} / \text{형질도입되지 않은 T 그룹의 원발성 AML 세포의 절대 세포 수})]$.

[0479] 인간 HLA-A2⁺ CD34⁺ 조혈 줄기/전구 세포(HSPC)를 이전에 기재한 바와 같이 이지셀 인간 CD34 양성 선택 키트(스템셀 테크놀로지(StemCell Technologies))에 의해 2명의 공여자의 태아 간으로부터 정제하였다(Chen, Q. et al(2013) *Stem Cells* 31:1160; Kaur, M. et al(2019) *J Immunol* 202:1885 참조). NPM1c CAR-T 세포를 표시된 이펙터:표적 비율로 CD34⁺ HSPC와 함께 항온처리하였다. 항온처리 24시간 후, 세포를 혈청이 없이 PBS에서 세척하고 제조업체의 프로토콜에 따라 생/사 고정형 죽은 세포 염색 키트(인비트로젠)를 사용하여 염색하였다. 그 후, 세포를 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 FITC-항-인간 CD8, PE-항 인간 CD34로 염색하였다. 상기한 바와 같이, 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 180 μ l의 FACS 완충액으로 재현탁시킨 후, 20 μ l의 정밀 계수 비드(바이오레전드)를 제조업체 지침에 따라 200 μ l의 총 부피까지 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포를 유세포 분석(LSR II HTS-1)에 의해 분석하였다. CD34⁺ HSPC의 절대 세포 수를 제조업체 지침의 공식에 따라 계산하였다. 각각의 샘플의 특이적 용해를 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다: 특이적 용해(%) = $100 \times [1 - (\text{CAR-T 그룹의 CD34⁺ HSPC의 절대 세포 수} / \text{형질도입되지 않은 T 그룹의 CD34⁺ HSPC의 절대 세포 수})]$. 본 연구에서 인간 조직의 사용은 매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지의 기관 감사 위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받았다.

[0480] **원발성 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ AML 이중이식편의 CAR-T 세포 사멸**

[0481] 환자-유래 원발성 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ AML 샘플을 다나-파버 캔서 인스티튜트로부터 구입하였다. 10주령의 NSG-SGM3(NSGS) 마우스를 잭슨 래보레이토리로 부터 구입하고, 매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지(MIT)의 특정 병원체-미포함(SPF) 사육장에 수용하였다. 마우스에서 인간 원발성 AML의 생착 효율을 개선하기 위해, 이전에 개시된 바와 같이, 원발성 AML 주사 24시간 전에, 인간 IL-3 및 GM-CSF를 인코딩하는 100 μ g의 DNA 플라스미드를 유체역학적으로 NSGS 마우스에 주사하였다(Chen, et al(2009) *PNAS* 106:21783 참조). NSGS 마우스를 250 cGy로 조사하고, 이어서 조사 후 24시간 이내에 1×10^6 개의 원발성 NPM1c⁺ HLA-A2⁺ AML 세포를 꼬리 정맥 주사하였다. 2주 후, GFP 발현을 기반으로 분류된 1×10^7 개의 CAR-T 세포 또는 활성화되었지만 형질도입되지 않은, 동일한 수의 인간 T 세포를 중앙-보유 마우스에 주사하였다. 꼬리 정맥 채혈에 의해 말초혈액에서 AML 부담을 정량화하고, 9일마다 유세포 분석(LSR 포르테사 HTS-2, BD 바이오사이언스)에 의해 분석하였다. AML 생착을 순환성 인간 CD45⁺ CD8⁻ 세포의 백분율로서 정의하였다.

[0482] 증식 검정

[0483] NPM1c CAR-T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포(1×10^5)를 37°C , 5% CO_2 에서 5일 동안, 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 어떠한 사이토카인도 없이, 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640에서 1×10^5 개의 NPM1c⁺HLA-A2⁺ OCI-AML3 세포와 함께 공동-배양하였다. 그 후, 세포를 수확하고 생/사 고정형 아쿠아 죽은 세포 염색(인비트로젠), FITC-항-인간 CD8(바이오레전드) 및 PE-항-인간 CD33(바이오레전드)으로 염색하고, 정밀 계수 비드(바이오레전드)를 유세포 분석에 따른 분석 전에 추가하였다. CD8⁺ T 세포의 절대 세포 수를 정밀 계수 비드의 제조업체의 지침의 공식에 따라 계산하였다. 세포내 Ki-67 염색을 위해, 세포를 세척하고, 생/사 고정형 아쿠아 죽은 세포 염색으로 염색한 후, CD8에 대해 표면 염색하고, 이어서 고정하고, 막투과화하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 PE-항-인간 Ki67(바이오레전드)로 세포내 염색하였다. 세포를 유세포 분석(LSRII HTS-1)에 의해 분석하고, 살아있는 CD8⁺ 림프구를 추가 분석을 위해 게이팅하였다.

[0484] 웨스턴 블롯팅

[0485] 동일한 수의 세포를 PBS로 세척하고 프로테아제 억제제가 보충된 RIPA 완충액에 용해시켰다. 전체 세포 추출물을 SDS 로딩 완충액에 용해시키고, 95°C 에서 5분 동안 끓이고, 10% SDS-PAGE를 사용하여 분리하고, PVDF 막으로 옮겼다. 5% 무지방 모유 TBS-T 용액으로 막을 차단한 후, 막을 돌연변이체 NPM1c(NB110-61646SS; 노버스바이오(NovusBio)) 또는 GAPDH(#3683; 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology))에 대해 특이적인 항체로 탐침하였다.

[0486] 실시예 1: 효모 표면 디스플레이에 의한 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 인간 scFv의 단리

[0487] AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 인간 scFv의 단리는, NPM1c 돌연변이를 갖는 AML에 대한 종양-특이적 CAR-T 요법 개발을 위한 기초를 형성하였다. 효모 표면 디스플레이(YSD)(Chao *et al.*, *NAT PROTOC* 1: 755(2006) 참조)를 이용하여 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적인 고-친화도의 scFv를 동정하였다. YSD는 유세포 분석에 의해 효모 세포 표면의 항원에 대한 이들의 결합을 기반으로 상이한 scFv 변이체 간의 정량적 식별을 가능하게 하기 때문에, 스크리닝 과정 중에 고-친화도의 scFv 선택을 달성할 수 있다. 또한, 효모-디스플레이 라이브러리는 인간 비장 B 세포 유래의 가변 영역 유전자 단편의 전체 레퍼토리를 사용하여 구성되었기 때문에(즉, 완전 인간 항체 서열), 단리된 scFv는 이미 인간 기원의 것이고, 감소된 면역원성을 갖는 바, 인간 사용을 위한 치료적 개발에 적합하다. AIQ-HLA-A2 복합체를 특이적으로 인식하는 scFv를 단리하기 위해, AIQ-HLA-A2 복합체를 양성 선택을 위해 사용하거나, HLA-A2 단독 또는 NY-ESO-1로부터 유래된 대조군 에피토프 펩티드가 로딩된 HLA-A2(SLLMWITQC(서열번호: 62), SLL-HLA-A2로 약칭됨)를 음성 선택을 위해 사용하고(도 1a 및 도 1b), 사용된 YSD 라이브러리를, 1×10^7 내지 1×10^9 개의 상이한 클론의 다양성을 갖는 것으로 추정하였다.

[0488] 일련의 양성 및 음성 선택을 수행하여, AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이성을 갖지만 HLA-A2에 대해서는 그렇지 않은 scFv를 암-고환 항원 NY-ESO-1 에피토프와 같은 다른 항원성 펩티드(SLLMWITQC(서열번호: 62), SLL-HLA-A2로 약칭됨)의 존재 또는 부재 하에서 단리하였다(도 1a 및 도 1b). 대략 1×10^{10} 개의 효모 세포(라이브러리 다양성의 적어도 10배)를, 가용성 비오틴-표지된 AIQ-HLA-A2 복합체에 이어서 스트렙타비딘-표지된 자기 비드와 항온처리하고, 자기-활성화 세포 분류 선택(MACS) 정제를 하였다(도 1b, 라운드 1). 양성으로 선택된 효모 세포를 대략 10배 확장시키고, 가용성 비오틴-표지된 SLL-HLA-A2 복합체에 이어서 스트렙타비딘-표지된 자기 비드와 항온처리하였고, MACS 음성 선택을 하였다(도 1b, 라운드 2). 결합되지 않은 효모 세포를 확장시키고, 가용성 비오틴-표지된 AIQ-HLA-A2 복합체에 이어서, 마우스 IgG에 대해 특이적인 PE-표지된 항체(HLA-A2 이량체의 Fc 부분, 도 1a) 및 scFv의 C-말단에서 c-Myc 에피토프를 검출하는, FITC-표지된 항-c-Myc 항체와 함께 항온처리하였다(도 1a). 도 1b(라운드 3, 플롯 #1)에 도시된 바와 같이, 효모 세포의 ~3.6%가 항-마우스 IgG 및 c-Myc 에피토프에 대해 양성이었다. 이중 양성 효모 세포를 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 단리하였다(도 1b, 라운드 3).

[0489] AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 scFv 특이성을 추가로 풍부하게 하기 위해서, 분류된 효모 세포를 확장시키고, 일련의 양성(비오틴-표지된 AIQ-HLA-A2 이용) 및 음성(비오틴-표지된 SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2 이용) 선택 받게 하고, 이어서 스트렙타비딘-APC 및 FITC-표지된 항-c-Myc 항체로 염색하고, 세포 분류하였다. 풍부함을 평가하기 위해, HLA-A2, GIL-HLA-A2 [인플루엔자 바이러스 M1 유래의 GILGFVFTL(서열번호: 63)(GIL로 약칭됨) 펩티드가 로딩된 HLA-A2(Choo *et al.*, *J VIROL* 88: 10613(2014) 참조)] 및 SLL-HLA-A2에 대해 비-특이적 결합, 및

AIQ-HLA-A2에 대해 특이적 결합인 경우에 대해 선택된 효모 세포를 분석하였다(도 1c). 예를 들어, 라운드 6(도 1b)에서, AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 높은 친화도를 갖는 scFv를 디스플레이하는 효모 세포를 정제하였다. 그러나, 정제된 효모 세포의 대부분은 HLA-A2 및 AIQ-HLA-A2 둘 모두에 결합하였지만, GIL-HLA-A2 및 SLL-HLA-A2에 대해서는 그렇지 않았고(도 1c, 플롯 #11-14), 이는 선택된 scFv의 대부분이 펩티드 없이 HLA-A2에 결합할 수 있음을 시사한다. AIQ-HLA-A2에 대해 특이적인 scFv를 디스플레이하는 효모 세포를 선택하기 위해, 효모 세포를 HLA-A2로 염색하였고, 세포 분류에 의해 HLA-A2-음성 효모 세포를 정제하였다(도 1b, 라운드 7, 플롯 #5). 선택된 효모 세포 중, 약 12%가 HLA-A2 및 c-Myc에 대해 양성이었다(도 1c, 플롯 #16), 22.8%가 AIQ-HLA-A2 및 c-Myc에 대해 양성이었다(도 1c, 플롯 #19), 1% 미만은 GIL-HLA-A2 또는 SLL-HLA-A2에 대해 양성이었으며(도 1c, 플롯 #17 및 18), 이는 AIQ-HLA-A2에 대한 scFv의 풍부함을 시사한다. 추가적인 양성 및 음성 선택(도 1b, 라운드 8 및 9)을 이용해, 효모 세포를 선택하였고, 이들은 AIQ-HLA-A2 및 c-Myc에 대해 주로 양성이었지만(~60%, 도 1c, 플롯 #29), HLA-A2에 대해서는 주로 음성이었다(<3%, 도 1c, 플롯 #26).

[0490] scFv의 서열을 동정하기 위해, 플라스미드 DNA를 선택된 효모 세포 풀로부터 추출하고, 대장균으로 형질전환시켰다. 25개의 단일 콜로니를 플라스미드 단리 및 서열분석을 위해 무작위로 선정하였다. 25개 중 24개는 동일한 scFv DNA 서열(YG1로 지칭됨, 하기 서열 섹션 참조)을 가졌고, 나머지 하나는 상이한 scFv DNA 서열(YG2로 지칭됨)을 가졌다. 그 후, YG1 및 YG2를 RJY100 컴피턴트 효모 세포로 개별적으로 형질전환시켰고, SGCAA 배지에서 효모 세포를 배양함으로써 scFv 발현을 유도하였다. 유세포 분석에 따른 분석은, c-Myc-양성 YG1-발현 효모 세포도 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 양성으로 염색되었지만 HLA-A2, GIL-HLA-A2 또는 SLL-HLA-A2 복합체에 대해서는 그렇지 않은 한편, c-Myc-양성 YG2 발현 효모 세포는 HLA-A2 및 AIQ-HLA-A2 모두에 대해 약하게 염색되었음을 보여주었다(도 1d). 이러한 결과는 YG1 유래의 scFv가 AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 특이적임을 보여준다.

[0491] **실시예 2: AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 YG1 scFv-Fc의 특이적이고 높은 친화도 결합**

[0492] YG1 scFv를 추가로 특징화하기 위해, YG1 scFv-Fc 융합 단백질을 전환가능한 효모 디스플레이/분비 시스템을 사용하여 제조하였다(도 2a). 융합 단백질을 단백질 A-수지를 사용하여 정제하고 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 비환원 조건에서, 주요 밴드는 대략 60, 140 및 260 kDa에서 검출되었으며, 이들은 단량체, 이량체 및 사량체 scFv-Fc 단백질 생성물의 크기에 해당한다(도 2b). 환원 시, 60 kDa 밴드의 강도는 증가하였고, 260 kDa 밴드는 사라졌으며, 이는 단량체 scFv-Fc 단백질 생성물의 예상 분자량과 일치한다. 140 kDa 밴드의 지속은 융합 단백질의 글리코실화와 같은 번역 후 변형으로 인한 것일 수 있다(Van Deventer et al., *PROTEIN ENG DES SEL* 28: 317 (2015) 참조).

[0493] NPM1c 돌연변이를 갖는 HLA-A2⁺ AML 세포주인, OCI-AML3(Quentmeier et al., *LEUKEMIA* 19: 1760 (2005) 참조); 야생형 NPM1을 갖는 HLA-A2⁺ AML 세포주인 OCI-AML2; 야생형 NPM1을 갖는 HLA-A2⁺ 림프아세포주인, T2(Lorente et al., *J BIOL CHEM* 286: 38054(2011) 참조); Myc 및 Bcl2의 과발현으로부터 유래된 HLA-A2⁺ B 세포 백혈병/림프종주로서, GMB(Leskov et al., *ONCOGENE* 32: 1066 (2013)); 및 야생형 NPM1을 갖는 HLA-A2⁻ 전립선 암 세포주인 PC-3(Matsueda et al., *PLOS ONE* 7: e45756(2012) 참조)를 포함하여, NPM1c 및 HLA-A2-양성 및 -음성 세포주 패널에서 AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 YG1 scFv-Fc 단백질의 특이적 결합을 유세포 분석을 이용하여 확인하였다. 세포를 HLA-A2에 대해 염색하였을 때, 예상대로, OCI-AML3, OCI-AML2, T2 및 GMB 세포는 양성이었다고 PC-3 세포는 음성이었다(도 2c). 세포를 YG1 scFv-Fc 융합 단백질로 염색한 후 PE-표지된 항-HA 항체로 염색하여 융합 단백질에서 HA 에피토프를 검출하였을 때(도 2a 참조), 거의 모든 OCI-AML3 세포가 양성이었지만 T2, GMB 또는 PC-3 세포 중 어느 것도 양성도 아니었다(도 2d). 또한, OCI-AML2 세포 중 어느 것도 양성도 아니었다(데이터는 도시되지 않음). 따라서, YG1 scFv는 NPM1c 돌연변이를 가진 인간 HLA-A2⁺ AML 세포 상의 AIQ-HLA-A2 복합체에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0494] AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 YG1 scFv-Fc의 친화도를 생물층 간섭기를 사용하여 측정하였다. 정제된 YG1 scFv-Fc 융합 단백질을 비오틴화하였고, 스트렙타비딘(SA) 바이오센서에서 포획하였다. AIQ-HLA-A2의 첨가 시, 결합 진폭이 농도 의존 방식으로 증가한 반면(도 2e), 결합 진폭은 SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2 복합체의 농도를 증가시켜 첨가 시 유의미하게 변하지 않았다. 결합 및 해리 역학에 기초하여, AIQ-HLA-A2와 YG1 scFv-Fc의 결합 상수(K_{on})는 $5.33 \pm 0.02 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ 이었고, 해리 상수(K_{off})는 $3.77 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이었으며, 평형 해리 상수(K_D)는 $7.07 \pm 0.08 \text{ nM}$ 이었다. 취합하면, 이러한 결과는 YG1 scFv-Fc 융합 단백질이 AIQ-HLA-A2 복합체에 높은 특이성과 친화도로 결합함을 보여준다.

[0495] 실시예 3: AIQ-HLA-A2 복합체에 특이적인 CAR-T 세포의 생성

[0496] NPM1c CAR을 구성하기 위해, YG1 scFv를, CD8 α 힌지 및 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB 공동 자극 도메인 및 CD3 ζ 활성화 도메인에 이어서 자가-절단 P2A 및 EGFP를 함유하는 CAR 백본 내로 프레임-내(in-frame) 클로닝하였다 (도 3a 및 도 3b 및 하기 서열 섹션). 대조군으로서, CD19에 대해 특이적인 CAR(CD19 CAR)을 발현하기 위해 동일한 구조적 백본을 사용하였다. 인간 CD8⁺ T 세포를 공여자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 정제하고, 항-CD3 및 항-CD28로 4일 동안 활성화시킨 후, NPM1c CAR 또는 CD19 CAR을 발현하는 렌티바이러스로 형질도입하거나 형질도입하지 않았다. 4일 후, 형질도입된 T 세포를 GFP⁺ 세포에 대해 분류함으로써 분리하고, 추가로 10일 동안 확장시켰다. 생성된 T 세포를 scFv를 인식하는 AF647 표지된 항-인간 IgG 중쇄 및 경쇄 항체로 염색함으로써 GFP 및 CAR 발현에 대해 분석하였다. 도 3c에 도시된 바와 같이, NPM1c CAR-발현 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포는 GFP 및 scFv 모두에 대해 양성인 반면, CD19 CAR-발현 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포는 GFP에 대해 양성이었지만 scFv에 대해서는 미약하게만 양성이었다. 후자는 아마도 CD19 scFv가 마우스 서열로부터 인간 화되기 때문일 것이다(미국 특허 공개 번호 2014/0271635 A1 참조). 생성된 NPM1c CAR-T 세포가 AIQ-HLA-A2 복합체를 특이적으로 인식하는지 여부를 결정하기 위해, CAR-T 세포를 비오틴화된 AIQ-HLA-A2, SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2와 함께 항온처리한 후, 스트렙타비딘-APC 염색하였다. GFP⁺ NPM1c CAR-T 세포는 AIQ-HLA-A2 복합체에 특이적으로 결합하였으나, SLL-HLA-A2 또는 HLA-A2에는 결합하지 않았으며(도 3d), 한편 형질도입되지 않은 T 세포 및 CD19 CAR T 세포 둘 모두는 3개의 복합체 중 어떠한 것에 대한 결합도 나타내지 않는다. 이러한 결과는 AIQ-HLA-A2 복합체에 대한 NPM1c-CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)의 특이성을 확인한다.

[0497] 실시예 4: 시험관내 NPM1c CAR-T 세포에 의한 인간 AML 세포의 특이적 사멸

[0498] NPM1c CAR-T 세포의 효능과 특이성을 조사하기 위해, 형질도입되지 않은 T 세포 및 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)를 OCI-AML3, GMB 및 PC-3 종양 세포와 함께 상이한 이펙터:표적(E:T) 비율로 24시간 동안 공동-배양하였다. T 세포 및 종양 세포의 상대적 비율을 CD8 + CD33(OCI-AML3의 경우), CD19(GMB의 경우) 또는 mCherry(PC-3의 경우)에 대한 유세포 분석 염색에 의해 정량화하였다. 도 4a 및 도 4b에 도시된 바와 같이, NPM1c CAR-T 세포는 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ OCI-AML3 세포를 투여량-의존적 방식으로 사멸시켰지만, E:T 비율에 관계 없이 HLA-A2⁺ NPM1c⁻ GMB 세포 또는 HLA-A2⁻ NPM1c⁻ PC-3 세포를 사멸시키지 않았다. 일관되게, 유의미하게 더 높은 백분율의 NPM1c CAR-T 세포는, GMB 또는 PC-3 세포와 비교하여 OCI-AML3 세포와 공동-배양하였을 때, 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 IFN- γ 를 발현하였다(도 4c, 왼쪽 패널의 막대 참조, 여기서 음영처리된 막대의 왼쪽 세트는 NPM1c CAR-T 세포에 해당하고, 음영처리된 막대의 오른쪽 세트는 형질도입되지 않은 T 세포에 해당함). 유사하게는, 유의미하게 더 높은 백분율의 NPM1c CAR-T 세포는 OCI-AML3 세포와 공동-배양하였을 때, 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 IL-2를 발현하였지만 백분율은 훨씬 낮았다(<2%)(도 4c, 오른쪽 패널의 막대 참조, 여기서 음영처리된 막대의 왼쪽 세트는 NPM1c CAR-T 세포에 해당하고, 음영처리된 막대의 오른쪽 세트는 형질도입되지 않은 T 세포에 해당함). 이러한 결과는 NPM1c CAR-T 세포가 시험관내에서 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ AML 세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있음을 보여준다. OCI-AML3 표적 세포와 공동-배양하였을 때 IL-2를 발현하는 NPM1c CAR-T 세포의 매우 작은 비율(<2%)은, OCI-AML3 세포의 표면에 존재하는 NPM1c 펩티드-HLA-A2 복합체의 낮은 밀도 때문일 수 있다. 이러한 가능성을 뒷받침하는, 문헌 [Watanabe et al.]은 T 세포 사이토카인 생성을 유도하는 데 필요한 표적 항원 밀도가 CAR-매개된 용해를 자극하는 데 필요한 것보다 훨씬 더 높다는 것을 보여주었다: CD20-특이적 CAR-T 세포는 CD20의 최저 밀도(~200 분자/세포)로 표적 세포를 용해시킬 수 있지만, 사이토카인 생성은 더 높은 CD20의 밀도(~5,000 분자/세포)를 필요로 하였다(Watanabe et al., *J IMMUNOL* 194: 911(2015)). 최근에는, 문헌 [Walker et al.]이 Nalm6 세포를 사용하여 CAR-T 세포를 활성화시키기 위해 필요한 항원 밀도를 조사하였고, CAR T 세포가 최저 CD20 발현으로 표적 세포를 용해시킬 수 있으며, 중간 정도의 항원 밀도로 IFN- γ 생성을 유도할 수 있지만, IFN- γ 생성(위와 동일)과 비교하여 IL-2 생성을 위해서는 CD20 밀도의 상당히 더 높은 역치가 필요하다는 것을 발견하였다. OCI-AML3 세포 상의 AIQ-HLA-A2의 밀도는 알려져 있지 않지만, 암 세포 상의 펩티드-MHC I 복합체의 밀도는 보통 100에서 수천 분자의 범위이고(Dubrovsky et al., *ONCOIMMUNOLOGY* 5: e1049803(2016)), 이는 CAR-T 세포의 세포용해 활성을 촉발시키기에는 충분하지만, 사이토카인을 생성하도록 CAR-T 세포를 촉발시키기에는 충분치 않을 수 있다(Watanabe et al., *FRONT IMMUNOL* 9: 2486(2018)). 이와 관련하여, 사이토카인 방출 증후군의 위험은, 펩티드-MHC 복합체를 표적화하는 CAR-T 세포를 사용하면, 예를 들어 고도로 발현된 TAA보다 잠재적으로 더 낮을 수 있다.

[0499] 표적 세포로 자극한 후 NPM1c CAR-T 세포에 의한 광범위한 사이토카인의 방출을 평가하기 위해, 쿠안티바디 인

간 사이토카인 어레이를 사용하여, OCI-AML3 표적 세포와 함께, 4명의 건강한 공여자로부터 제조된 형질도입되지 않은 T 세포 또는 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)의 공동-배양 유래의 상청액에서 20가지 인간 사이토카인 및 케모카인의 분비를 정량적으로 측정하였다. 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 NPM1c CAR-T 세포 유래의 상청액에서, GM-CSF(4명의 공여자 중 4명), IL-13(4명의 공여자 중 4명), MIP-1 β (4명의 공여자 중 4명), IL-8(4명의 공여자 중 4명), IFN- γ (4명의 공여자 중 3명), MIP-1 α (4명의 공여자 중 3명), RANTES(4명의 공여자 중 3명), IL-2(4명의 공여자 중 2명), MCP-1(4명의 공여자 중 2명)의 유의미하게 증가된 분비를 확인하였다(도 4d).

[0500] NPM1c⁺HLA-A2⁺ 표적 세포가 NPM1c CAR-T 세포의 증식을 자극하는지 여부를 평가하기 위해, NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함) 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 OCI-AML3 세포와 함께 5일 동안 공동-배양하였고, T 세포 수 및 Ki-67 발현을 유세포 분석에 의해 정량화하였다. NPM1c CAR-T 세포의 절대 수는, 정밀 계수 비드를 사용하여 유세포 분석에 의해 결정하였을 때, 형질도입되지 않은 T 세포의 것보다 유의미하게 더 높았다(도 4e). Ki-67의 증가된 발현은 세포내 Ki-67 염색의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정하였을 때, 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 NPM1c CAR-T 세포에서 관찰되었다(도 4f). 이러한 결과는 NPM1c⁺HLA-A2⁺ 표적 세포에 반응하여 증식하는 NPM1c CAR-T 세포의 능력을 나타낸다.

[0501] NPM1c⁺HLA-A2⁺ AML 세포를 표적화함에 있어서 NPM1c CAR-T 세포의 특이성을 추가로 확인하기 위해, HLA-A2⁺ OCI-AML2 세포 및 HLA-A2⁻ PC-3 세포를 렌티바이러스로 형질도입하여 NPM1c를 안정적으로 발현시켰다(데이터는 도시되지 않음). 외인성 NPM1c 발현 후, HLA-A2⁺ OCI-AML2 세포를 YG1 scFv-Fc에 대해 양성으로 염색하였고(데이터는 도시되지 않음), 이는 E:T 비율-의존적 방식으로 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)에 의해 사멸되었다(도 4g). 그러나, NPM1c-발현 HLA-A2⁻ PC-3 세포를 YG1 scFv-Fc에 의해 염색하지 않았고(데이터는 도시되지 않음), 형질도입되지 않은 T 세포와 비교할 때, 어떠한 E:T 비율에서도 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)에 의해 사멸되지 않았다(도 4h).

[0502] 추가적으로, T2 세포에 상이한 펩티드를 로딩하여 NPM1c CAR-T 세포의 항원 특이성을 입증하였다. T2 세포는 HLA-A2⁺이지만 항원 처리와 관련된 수송체(TAP)가 결핍되어 있다. 따라서, T2 세포 표면 상의 많은 HLA-A2 분자는 내인성 펩티드로 로딩되지 않지만, 외인성 펩티드로 로딩될 수 있다(예를 들어, Hosken, N., et al., *SCIENCE* 248:367(1990); Bossi, G. et al., *ONCOIMMUNOLOGY* 2:e26840(2013) 참조). T2 세포를 0.1 μ M로부터 1 μ M 내지 10 μ M 범위의 상이한 농도의 NPM1c 펩티드(AIQ) 또는 NY-ESO-1 펩티드(SLL)로 펄스화시켰다. SLL 펩티드가 아닌 AIQ 펩티드로 펄스화된 T2 세포를 YG1 scFv-Fc에 의해 염색시켰다(도 4i). 일관되게, NPM1c CAR-T(YG1 scFv 포함)는 펩티드 농도-의존적 방식으로 AIQ-펄스화된 T2 세포를 사멸시켰지만, SLL-펄스화된 T2 세포에 대해서는 그렇지 않았다(도 4j). 이러한 결과는 NPM1c CAR-T 세포 인식의 특이성 및 세포 표면 상의 NPM1c-HLA-A2 복합체를 가진 표적 세포의 사멸을 추가로 뒷받침한다.

[0503] **실시예 5: NPM1c CAR-T 요법이 백혈병 부담을 감소시키고 생존을 연장시킨다**

[0504] 생체내에서 NPM1c CAR-T 세포의 항-종양 활성을 테스트하기 위해, NSG 마우스에 루시페라제-발현 OCI-AML3 AML 종양 세포를 정맥내 주사하였다(마우스당 1×10^6 , 도 5a). 주사 4일 후 생물발광 영상화(BLI)에 의해 생착을 확인한 후, 마우스에 CAR-T 또는 대조군 형질도입되지 않은 T 세포(마우스당 1×10^7 세포)를 정맥내로 1회 주사를 제공하였다. BLI를 이용하여 3일마다 백혈병 부담을 모니터링하였다. NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)로 처리된 마우스는 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 마우스와 비교할 때 백혈병 부담의 상당한 감소를 보여주었고, 생존이 연장되었다(도 5b 및 도 5c). 생체내 NPM1c CAR-T 세포 사멸의 특이성을 테스트하기 위해, NSG 마우스에 루시페라제-발현 인간 HLA-A2⁺CD19⁺GMB 세포를 주사하였다(Leskov et al., *ONCOGENE* 32: 1066 (2013); Pallasch et al., *CELL* 156: 590 (2014)). 종양-보유 마우스에 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함), 형질도입되지 않은 T 세포 또는 CD19 CAR-T 세포를 단일 투여량으로 제공하였다. 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여, NPM1c CAR-T 세포는 생존을 연장시키거나 림프종 부담을 감소시키지 않은 반면, CD19 CAR-T 세포는 림프종 부담을 크게 감소시켰고 생존을 연장시켰다(도 5d 및 도 5e). 이러한 결과는 NPM1c CAR-T 세포가 생체내에서 HLA-A2⁺ 및 NPM1c⁺인 AML을 사멸시킬 수 있지만, NPM1c 돌연변이가 없는 HLA-A2⁺ 림프종 세포에 대해서는 그렇지 않음을 보여주며, 이는 정교한 특이성을 입증한다.

[0505] OCI-AML2 세포는 OCI-AML3 세포와 유사한 배경을 갖지만, 야생형 NPM1 단백질을 발현한다(예를 들어, van der Lee, D. I. *et al.*, *J CLIN INVEST* **129** 774(2019) 참조). NPM1c CAR-T 세포 특이성에 대한 음성 대조군으로서, NSG 마우스에 루시페라제-발현 OCI-AML2 세포(마우스당 1×10^6)를 주사하고, 이어서 4일 후에, NPM1c CAR-T(YG1 scFv 포함) 또는 대조군 형질도입되지 않은 T 세포를 1회 정맥내 주사하였다(마우스 당 1×10^7 세포). 도 5f에 도시된 바와 같이, NPM1c CAR-T 세포는 PBS 대조군 또는 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 OCI-AML3 백혈병 부담을 효과적으로 감소시켰다. 그러나, NPM1c CAR-T 세포는 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 NSG 마우스에서 OCI-AML2 백혈병 부담을 감소시키지 않았고, 처리된 마우스의 생존을 연장하지도 않았다(도 5g-5h). 이러한 결과는 NPM1c CAR-T 세포가 NPM1c-양성 AML 세포를 특이적으로 사멸시키지만 NPM1c-음성 AML 세포에 대해서는 그렇지 않다는 것을 추가로 뒷받침한다.

[0506] 실시예 6: NPM1c CAR-T 요법이 상이한 조직에서 백혈병 세포 수를 감소시킨다

[0507] NPM1c CAR-T 세포의 항-백혈병 활성을 조사하기 위해, CAR-T 세포 이식 18일 후 유세포 분석에 의해 상이한 조직에서 CAR-T 세포 및 백혈병 세포를 분석하였다. 도 6a에 도시된 바와 같이, 백혈병 부담은 T 세포 이식 당일(OCI-AML3 주사 후 4일차)에서 유사하였으나, T 세포 이식 18일 후까지, 형질도입되지 않은 T 세포를 받은 마우스보다 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)를 받은 마우스에서 백혈병 부담이 유의미하게 더 낮았다. 18일차에 혈액, 비장, 골수 및 간을 수확하였고, 단일 세포懸탁액을 제조하고, 마우스 CD45(mCD45), 인간 CD45(hCD45), hCD8, hCD33, hPD-1 및 hTim-3에 대해 염색하였다. 도 6b-6c에 도시된 바와 같이, hCD45⁺ 세포는 hCD8⁺ T 세포 및 hCD33⁺ 백혈병 세포로 구성되었다. hCD33⁺ 백혈병 세포의 수와 백분율은, 4개 조직 모두에서, 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 마우스보다 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)로 처리된 마우스에서 유의미하게 더 낮았다(도 6d 및 도 6e). 일관되게, 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 마우스보다 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)로 처리된 마우스에서 hCD8⁺ T 세포의 백분율이 4개 조직 모두에서 더 높았다. 또한, hCD33⁺ 백혈병 세포에 대한 hCD8⁺ T 세포의 비율은, 모든 조직에서, 형질도입되지 않은 T 세포가 제공된 마우스보다 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)로 처리된 마우스에서 유의미하게 더 높았다(도 6f). 또한, 인간 CD8⁺ T 세포를 PD-1 및 Tim-3 발현에 대해 분석하였다(도 6c). PD-1을 발현한 hCD8⁺ T 세포의 백분율이 혈액, 비장, 골수 및 간에서 상당히 달랐지만, 동일한 조직에서는 형질도입되지 않은 T 세포 또는 NPM1c CAR-T 세포가 제공된 마우스들 사이에 유의미한 차이는 없었다(도 6g). 흥미롭게도, Tim-3을 발현한 T 세포의 백분율은 NPM1c CAR-T 세포가 제공된 마우스의 비장 및 골수에서 유의미하게 더 높았지만, 그 백분율은 낮았다(<5%)(도 6h). 이러한 결과는 도 5b 및 6a에서 백혈병 부담의 생물발광 영상 분석에 기초한 결과와 일치한다.

[0508] NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함) 또는 형질도입되지 않은 T 세포 또는 PBS를 주사한 30일 후 생존한 마우스로부터의 골수에서 백혈병 부담을 추가로 분석하였다(도 5f에 나타내고 실시예 5에 기재된 마우스). OCI-AML3 백혈병 세포는 4마리의 NPM1c CAR-T-처리된 마우스 중 3마리의 골수에서 거의 완전히 부재한 반면(도 6i), 많은 인간 T 세포 집단이 골수에서 검출되었다. 대조적으로, 형질도입되지 않은 T 세포로 처리된 1마리의 생존 마우스(다른 마우스는 30일 이내에 사망했음) 및 PBS로 처리된 두 마리의 생존 마우스(다른 마우스는 30일 이내에 사망했음)로부터의 골수에서 다수의 백혈병 세포가 검출되었다(도 6i). 따라서 NPM1c CAR-T 세포는 골수에서 OCI-AML3 세포를 확장 및 사멸시킬 수 있고, 질환 진행을 유의미하게 통제할 수 있을 것으로 보인다.

[0509] 실시예 7: NPM1c CAR-T 세포는 시험관내 및 생체내에서 원발성 인간 AML 아세포를 효과적으로 사멸시킨다

[0510] NPM1c CAR-T 세포가 NPM1c+HLA-A2+ 원발성 AML 아세포를 사멸하는지 여부를 추가로 평가하였다. 3명의 상이한 공여자 유래의 NPM1c+HLA-A2+ 원발성 AML 아세포를 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함)와 함께 상이한 E:T 비율로 항온처리하였고, AML 아세포의 수를 24시간 후 정밀 계수 비드로 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 사멸 활성은 샘플 간에 가변적이었지만, 3개의 모든 원발성 AML 샘플은 E:T 비율-의존적 방식으로 NPM1c CAR-T 세포에 의해 효과적으로 사멸되었다. 대조적으로, 두 명의 다른 공여자로부터의 인간 HLA-A2⁺ CD34⁺ 조혈 줄기/전구 세포(HSPC)는 YG1 scFv-Fc에 의해 염색되지 않았고(도 7b 및 도 7c), 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 NPM1c CAR-T 세포에 의해 사멸되지 않았다(도 7d 및 도 7e).

[0511] 환자-유래 이중이식편에서 NPM1c CAR-T 요법의 효능을 평가하기 위해, NSGS 마우스에 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ 인간 원발성 AML 아세포를 주사하였다. 인간 원발성 AML의 생착 효율을 개선하기 위해, 이전에 기재된 바와 같이, NSGS 마우스에 원발성 AML 주사 24시간 전에 인간 IL-3 및 GM-CSF를 인코딩하는 100 µg DNA 플라스미드를 유체역학

적으로 주사하였다(예를 들어, Chen, Q et al(2009) *PNAS* 106:21783 참조). AML 부담을 꼬리 정맥 채혈 및 인간 CD45⁺ CD8⁻ 세포에 대한 유세포 분석 검정에 의해 말초 혈액에서 정량화하였다. AML 아세포를 주사 2주 후 혈액에서 검출하였고(도 7f), 마우스에 NPM1c CAR-T 세포(YG1 scFv 포함) 또는 형질도입되지 않은 T 세포를 주사하였다. 혈액 내 AML 아세포 수준을 9일마다 모니터링하였다. 도 7f 및 도 7g에 도시된 바와 같이, AML 아세포의 수준은 T 세포 주입 후 9일 및 18일 모두에서 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 NPM1c CAR-T 세포로 처리된 마우스에서 감소하였다. 그 차이는 18일차까지 현저해졌다. 이러한 결과는 NPM1c CAR-T 세포가 환자-유래 이종이식 모델에서 원발성 HLA-A2⁺ NPM1c⁺ AML 아세포를 사멸시키는 데에도 효과적임을 보여준다.

[0512] 참조문헌

- 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 cytoplasmic NPM1

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 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., Moriarity, 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).

부록 1

- 특이적 항-AIQDLCLAV:HLA-A2 항체의 선택을 위한 단계의 예(어떠한 이론에 구속되지 않고, 실시예 1에 기초함):
- 1차 라운드 선택:
- 자기 분류(MACS)에 의한 비오틴화된 AIQ-HLA-A2 항원에 양성 결합하는 효모 집단의 선택.

- [0523] 2차 라운드 선택:
- [0524] 다른 펩티드-HLA-A2 복합체 항원에 결합할 수 있는 분류된 효모 세포를 제외하기 위해, 대조군 펩티드(SLL)-HLA-A2 복합체를 사용하여, 1단계로부터 분류된 효모 세포를 염색하고, 자기 분류에 의해 SLL-HLA-A2 항원에 결합하지 못하는 효모 세포를 수집하는 것.
- [0525] 3차 라운드 선택:
- [0526] 1차 및 2차 라운드의 선택은, 1 x 10¹⁰ 효모 세포까지, AIQ-HLA-A2 복합체에 결합할 수 있는 효모 세포를 대략적으로 풍부하게 할 수 있다. 도 1b#1에 도시된 바와 같이, MACS 분류의 2 라운드 후에, AIQ-HAL-A2 복합체 항원 및 scFv 발현에 대해 이중-양성으로 염색된 세포는 단 3.64%였다. 따라서, 3차 라운드의 선택에서, 이러한 이중-양성 효모 세포의 3.64%는 유세포 분석 분류에 의해 분류될 수 있다.
- [0527] 4차 라운드 선택:
- [0528] 도 1b#2에 도시된 바와 같이, 3차 선택은 AIQ-HAL-A2 복합체 항원 및 scFv 발현에 대해 이중-양성으로 염색된 효모 집단을 추가로 풍부하게 할 수 있다(41.4%). 따라서, 4차 라운드의 선택에서, 이러한 이중-양성 효모 세포의 41.4%는 유세포 분석 분류에 의해 추가로 분류될 수 있다.
- [0529] 5차 라운드 선택:
- [0530] 도 1c #1-#4에 도시된 바와 같이, 4차 선택은 AIQ-HAL-A2 복합체 항원 및 scFv 발현에 대해 이중-양성으로 염색된 효모 집단을 추가로 풍부하게 할 수 있다(45.1%). 그러나, GIL-HAL-A2 또는 SLL-HLA-A2 복합체 및 scFv 발현에 대해 이중-양성으로 염색된, 소규모의 효모 세포가 있었다. 따라서, 5차 라운드의 선택에서, 다른 펩티드-HLA-A2 복합체 항원에 결합할 수 있는 효모 세포를 추가로 제외하기 위해, SLL-HLA-A2 복합체를 이용하여 4차 라운드 선택에서 분류된 효모 세포를 염색할 수 있고, SLL-HLA-A2 항원에 대해 scFv-양성이지만 음성으로 염색된, 분류된 효모 세포를 분류할 수 있다(도 1b#3).
- [0531] 6차 라운드 선택:
- [0532] 도 1c #7-9에 도시된 바와 같이, 5차 선택은 AIQ-HAL-A2 복합체 항원 및 scFv 발현에 대해 이중-양성으로 염색된 효모 집단을 추가로 풍부하게 할 수 있고(55.8%), 대조군 펩티드 GIL 또는 SLL-HLA-A2 복합체에 양성 결합된 효모 세포의 백분율을 감소시킬 수 있다. 예상외로, 본 발명자들은 AIQ-HLA-A2에 대해 양성으로 염색된 대부분의 효모 세포가 HLA-A2 단백질에 대해서도 양성으로 염색되었음을 발견하였다(28.1%, 도 1c#6). 6차 선택에서, AIQ-HLA-A2 복합체에 고친화도로 결합하는 효모 집단이 분리될 수 있다(도 1b#4).
- [0533] 7차 라운드 선택:
- [0534] 도 1c #14에 도시된 바와 같이, 6차 선택은 AIQ-HAL-A2 복합체 항원에 고-친화도로 결합하는 효모 집단을 풍부하게 하였다(74.9%); 그러나 이는 또한 HAL-A2 항원에 고-친화도로 결합하는 효모 집단을 풍부하게 하였고(76.7%), 이는 분류된 효모 세포의 거의 전부가 HLA-A2 단독에 결합할 수 있음을 나타내었다. 따라서, 7차 라운드의 선택에서 HLA-A2 항원에 음성으로 결합된 효모 세포(~0.5%)를 분류할 수 있다. 7차 라운드의 선택 후, 본 발명자들은 AIQ-HLA-A2에 대해 양성으로 염색된 효모 집단이 풍부해진 반면(22.8%, 도 1c#19), HLA-A2 단독에 대해 양성으로 염색된 효모 집단의 백분율은 감소되었음을 발견하였다(12.1%, 도 1c#16).
- [0535] 8차 라운드 선택:
- [0536] AIQ-HLA-A2 복합체에 대해 양성으로 염색된 효모 집단을 추가로 풍부하게 하기 위해, AIQ-HLA-A2 염색-양성 효모 세포를 도 1b#6에 도시된 바와 같이, 8차 선택에서 추가로 분류할 수 있다. 이 선택 후, AIQ-HLA-A2 복합체에 고-친화도로 결합하는 효모 세포의 최대 69.5%가 풍부해졌으나(도 1c#24), 이러한 효모 세포의 절반은 여전히 HLA-A2 항원 단독에 양성 결합되어 있었다(31.3%, 도 1c#21).
- [0537] 9차 라운드 선택:
- [0538] HLA-A2 항원 단독에 결합할 수 있는 효모 집단을 추가로 제외하기 위해, HLA-A2 항원 단독에 대해 음성 염색된 효모 세포를 추가로 분류할 수 있다(도 1b#7). 이 선택 후, AIQ-HLA-A2 복합체에 고-친화도로 결합하는 효모 세포는 고도로 풍부해졌고(60.6%, 도 1c#29), 단지 2.87%의 효모 세포(도 1c#26)만이 HLA-A2 항원 단독에 결합되었다.

[0539] 서열

서열번호:	설명	서열
1	NPM1c의 백혈병-특이적 신생항원 에피토프	AIQDLCLAV
2	YG1 scFv 아미노산 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY STPLTFGQGTKVEIKSGILGTTAASGSSGGSSSGAEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPT TTL L PFDYWGQGT L VTVSS
3	YG1 scFv VL 아미노산 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY STPLTFGQGTKVEIKSGILGTTA
4	YG1 scFv 링커 아미노산 서열	SGSSGGSSSG
5	YG1 scFv VH 아미노산 서열	AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARLGYPTTTL L PFDYWGQGT L VTVSS
6	YG1 scFv VL CDR1 아미노산 서열(IMG1)	QSISSY
7	YG1 scFv VL CDR2 아미노산 서열(IMG1)	AAS
8	YG1 scFv VL CDR3 아미노산 서열(IMG1)	QQSYSTPLT
9	YG1 scFv VH CDR1 아미노산 서열(IMG1)	GFTFSSYA
10	YG1 scFv VH CDR2 아미노산 서열(IMG1)	ISGSGGST
11	YG1 scFv VH CDR3 아미노산 서열(IMG1)	ARLGYPTTTL L PFDY
12	YG1 scFv 핵산 서열	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC AGTACCCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAT CCGGAATTCTAGGTACTACTGCCGCTAGTGGTAGTAGTGGTGGCAG TAGCAGTGGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCICCTGTGTCAGCCTCTGGAT

[0540]

		TCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTGGGTACCCTACT ACTACCCCTACTACCCCTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCA CTGTCTCCAGT
13	YG1 scFv VL 핵산 서열	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG CTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC AGTACCCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATCAAAT CCGGAATTCTAGGTACTACTGCCGCT
14	YG1 scFv 링커 핵산 서열	AGTGGTAGTAGTGGTGGCAGTAGCAGTGGT
15	YG1 scFv VH 핵산 서열	GCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAG CAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTGGGTACCCTACTACTACCCTAC TACCCTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACTGTCTCCAG T
16	YG1 scFv VL CDR1 핵산 서열 (IMGT)	CAGAGCATTAGCAGCTAT
17	YG1 scFv VL CDR2 핵산 서열 (IMGT)	GCTGCATCC
18	YG1 scFv VL CDR3 핵산 서열 (IMGT)	CAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACG
19	YG1 scFv VH CDR1 핵산 서열 (IMGT)	GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCC
20	YG1 scFv VH CDR2 핵산 서열 (IMGT)	ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA
21	YG1 scFv VH CDR3 핵산 서열 (IMGT)	GCGAGGCTGGGTACCCTACTACTACCCTACTACCCTTTGATTAC

[0541]

22	NPM1c CAR 아미노산 서열(YG1 scFv 포함)	MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKSGILGTTAAS GSSGSSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARLGYPTTLLPFDYWGQGT LVTVSSTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRATNFSLLKQAGDV EENPGPMVSKGEELFTGVVPIVLVDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTTLKFICTTCKLPVPWPTLVTTITLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFK SAMPEGYVQERTIFFKDDGNKYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFK EDGNILGHKLEYNNSHNHYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQ LADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLF VTAAGITLGMDELYK
23	NPM1c CAR 내 선도 서열의 아미노산 서열	MALPVTALLPLALLLHAARP
24	NPM1c CAR 내 YG1 scFv 의 아미노산 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY STPLTFGQGTKVEIKSGILGTTAASGSSGSSGAEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYPT TLLPFDYWGQGT LVTVSS
25	NPM1c CAR 내 CD8 힌지 및 막횡단 영역의 아미노산 서열	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
26	NPM1c CAR 내 4- 1BB 신호전달 도메인의 아미노산 서열	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL
27	NPM1c CAR 내 CD3-제타 신호전달 도메인의 아미노산 서열	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
28	NPM1c CAR 내 P2A 자가-결단 펩티드의 아미노산 서열	ATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0542]

29	NPM1c CAR 내 EGFP 영역의 아미노산 서열	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLK FICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEG YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDMVLLEFVTAAGI TLGMDELYK
30	NPM1c CAR 핵산 서열(YG1 scFv 포함)	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGC TCCACGCCGCTCGGCCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAG GGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC ACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGGAC CAAGGTGGAAATCAAATCCGGAATTCTAGGTACTACTGCCGCTAGT GGTAGTAGTGGTGGCAGTAGCAGTGGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGG AGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GGCTGGGTTACCTACTACTACCTACTACCTTTGATTACTGGGG CCAAGGTACCTGGTCACTGTCTCCAGTACCACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCC TGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATAC CCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTG GCTGGTACTTTCGGGGTCTGCTGCTTTTCACTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTC TGCCGGTTCCTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGA AATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAA CCAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGAC

[0543]

		GTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGC CGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAA GGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAA CGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCC GCCTCGGGGATCCGGCGCAACAACTTCTCTCTGCTGAAACAAGCC GGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACCGATGGTGAGCAAGGGCGAGG AGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCA AGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGG CGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGC TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCA TCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAA GTTGAGGGGCGACACCCCTGGTGACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC AGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCG ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTC CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGT CTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTAACAAGTGA
31	NPM1c CAR 내 선도 서열의 핵산 서열	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGC TCCACGCCGCTCGGCC
32	NPM1c CAR 내 YG1 scFv 의 핵산 서열	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC AGTACCCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAT CCGGAATTCTAGGTACTACTGCCGCTAGTGGTAGTAGTGGTGGCAG TAGCAGTGGTGGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACGGCGGTGTATTACTGTGCGAGGCTGGGTTACCCCTACT ACTACCTACTACCCTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCCCTGGTCA CTGTCTCCAGT
33	NPM1c CAR 내 CD8 인지 및 막칭 단 핵산 서열	ACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGC

[0544]

		TGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATC TACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTT CACTCGTGATCACTCTTTACTGT
34	NPM1c CAR 내 4- 1BB 신호전달 도메인의 핵산 서열	AAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCA TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCG GTTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCCAACTG
35	NPM1c CAR 내 CD3-제타 신호전달 도메인의 핵산 서열	CGCGTGAAATTCAGCCGCGAGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGG GGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGA GTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGC GGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGC TCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAA AGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG
36	NPM1c CAR 내 P2A 자가-결단 펩티드의 핵산 서열	GCAACAACTTCTCTCTGCTGAAACAAGCCGGAGATGTCGAAGAGA ATCCTGGACCG
37	NPM1c CAR 내 EGFP 영역의 핵산 서열	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCC TGGTCGAGCTGGACGCGGACGTAACCGGCCACAAGTTGAGCGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG TTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCG TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGA CCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGACACCCTGGTGAACCG CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG GGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCG CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCACTGCGCCGACCACTACCAG CAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACC ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA GCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGGATC ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA
38	인간 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[0545]

39	인간 IgG4(말단 K 부재)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLG-
40	인간 IgG4 단일 돌연변이체(S228 P)(말단 K 부재)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCP P CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLG-
41	인간 IgG4 이중 돌연변이체(S228 P)(L235A)(말단 K 부재)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCP P CPAPEF E GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLG-
42	인간 IgG4 이중 돌연변이체(S228 P)(L235A)(말단 K 부재)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNT KVDKRVESKYGPPCP P CPAPEF A GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLG-
43	CD20 아미노산 서열	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRMRSSSLVGPTQSF RESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWVYPLWGGI MYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDI LNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCY SIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLL SAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETE TNFPEPPQDQESSPIENDSSP
44	FLAG	DYKDDDDDK
45	폴리히스티딘(6-His)	HHHHHH
46	혈구 응집소(HA)	YPYDVDPDYA
47	HCDR1.1(항-CD3) 아미노산 서열	GYTFTRYTMH

[0546]

48	HCDR1.2(항-CD3) 아미노산 서열	RYTMH
49	HCDR2(항-CD3) 아미노산 서열	YINPSRGYTNYNQKFCD
50	HCDR3(항-CD3) 아미노산 서열	YYDDHYCLDY
51	LCDR1(항-CD3) 아미노산 서열	RASSSVSYMN
52	LCDR2(항-CD3) 아미노산 서열	DTSKVAS
53	LCDR3(항-CD3) 아미노산 서열	QQWSSNPLT
54	인간 야생형 뉴클레오포스민 (아미노산 서열 - # NM_002520)	MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSLRT VSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVLATLKMSVQPTVSLGGF EITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAEESEDEEEEDVKLLSI SGKRSAPGGGSKVPQKKVKLADEDDDDDEEDDDDDDDDDFDDE EAEEKAPVKKSIIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKK QEKTPTKTPKGPSSVEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLWQWRKSL
55	인간 야생형 뉴클레오포스민 의 C-말단 (아미노산 서열)	MTDQEAIQDLWQWRKSL
56	돌연변이체 <i>NPM1c</i> 유전자에 의해 인코딩된 인간 뉴클레오포스민 (아미노산 서열)	MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDENEHQLSLRT VSLGAGAKDELHIVEAEAMNYEGSPIKVLATLKMSVQPTVSLGGF EITPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVEEDAEESEDEEEEDVKLLSI SGKRSAPGGGSKVPQKKVKLADEDDDDDEEDDDDDDDDDFDDE EAEEKAPVKKSIIRDTPAKNAQKSNQNGKDSKPSSTPRSKGQESFKK QEKTPTKTPKGPSSVEDIKAKMQASIEKGGSLPKVEAKFINYVKNCFRMTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK
57	C-terminus of 인간 뉴클레오포스민 encoded by 돌연변이체 <i>NPM1c</i> gene(아미노산 서열)	MTDQEAIQDLCLAVEEVSLRK
58	링커	(Gly4Ser) 1
59	링커	(Gly4Ser) 2
60	링커	(Gly4Ser) 3
61	링커	(Gly4Ser) 4
62	NY-ESO-1 네오에피토프(SL L)	SLLMWITQC
63	인플루엔자 바이러스 M1 단백질	GILGFVFTL

[0547]

	네오에피토프(GI L)	
64	정방향 프라이머	GTCAGTAATTGCGGTTCTCACC
65	역방향 프라이머	GTACAGTGGGAACAAAGTCG
66	정방향 프라이머	CCGGGGTAGAACCTAAAAGTTCCG
67	역방향 프라이머	TTTGTTCTGCACGCGTGGATC
68	정방향 프라이머	GGGTAATTAATCAGCGAAGCGATG
69	정방향 프라이머	GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT
70	역방향 프라이머	AGGCACAATCAGCATTGGTAGCTG
71	NPM1c 네오에피토프	AIQDLCAVAV
72	NPM1c 네오에피토프	CLAVEEVSL
73	NPM1c 네오에피토프	VEEVSLRK
74	NPM1c 네오에피토프	AVEEVSLR
75	NPM1c 네오에피토프	AVEEVSLRK
76	NPM1c 네오에피토프	CLAVEEVSLRK
77	AIQ X ₁ 치환	VIQDLCLAV
78	AIQ X ₁ 치환	LIQDLCLAV
79	AIQ X ₁ 치환	IIQDLCLAV
80	AIQ X ₃ 치환	AINDLCLAV
81	AIQ X ₄ 치환	AIQELCLAV
82	AIQ X ₅ 치환	AIQDICLAV
83	AIQ X ₅ 치환	AIQDVCLAV
84	AIQ X ₅ 치환	AIQDMCLAV
85	AIQ X ₅ 치환	AIQDACLAV
86	AIQ X ₅ 치환	AIQDFCLAV
87	AIQ X ₆ 치환	AIQDLCLAV
88	AIQ X ₆ 치환	AIQDLALAV
89	AIQ X ₇ 치환	AIQDLCLAV
90	AIQ X ₇ 치환	AIQDLCAVAV
91	AIQ X ₇ 치환	AIQDLCLAV
92	AIQ X ₇ 치환	AIQDLCAAV
93	AIQ X ₇ 치환	AIQDLCLAV
94	AIQ X ₈ 치환	AIQDLCLVV
95	AIQ X ₈ 치환	AIQDLCLLV
96	AIQ X ₈ 치환	AIQDLCLIV

[0548]

[0549]

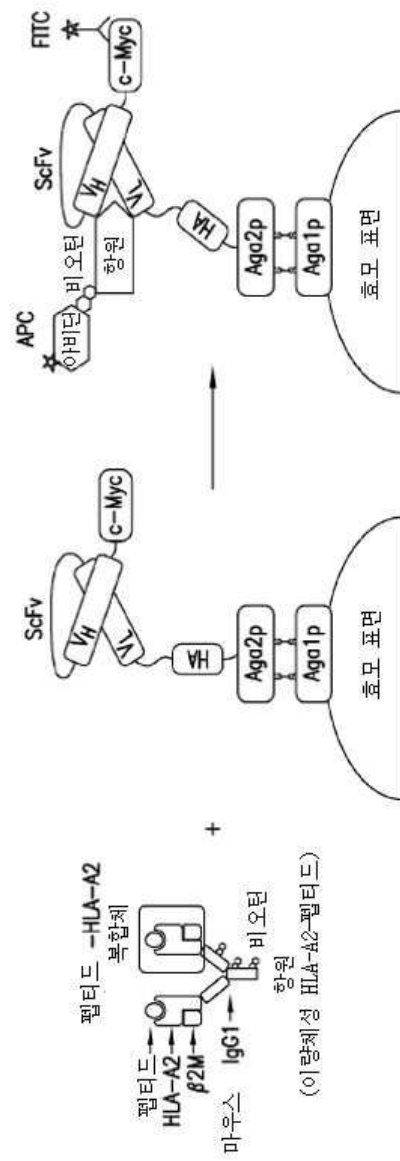
참조문헌 포함

[0550]

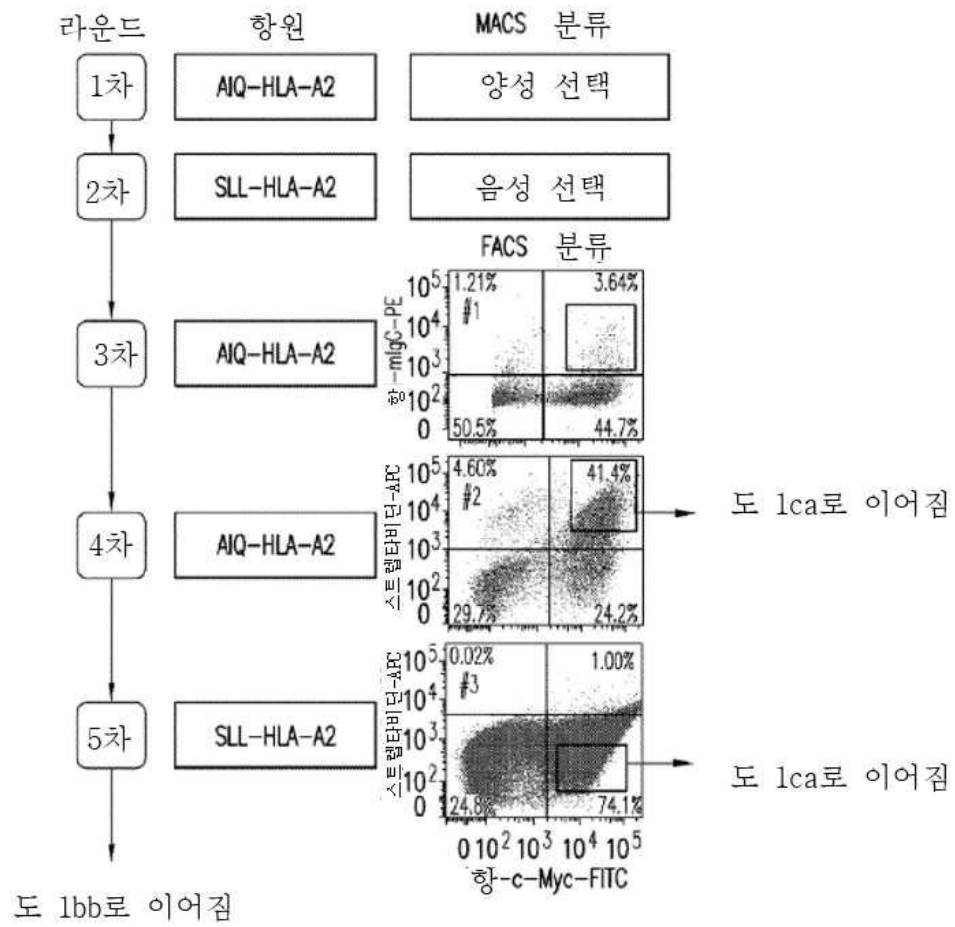
본원에 인용된 모든 참조문헌, 예컨대 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도면

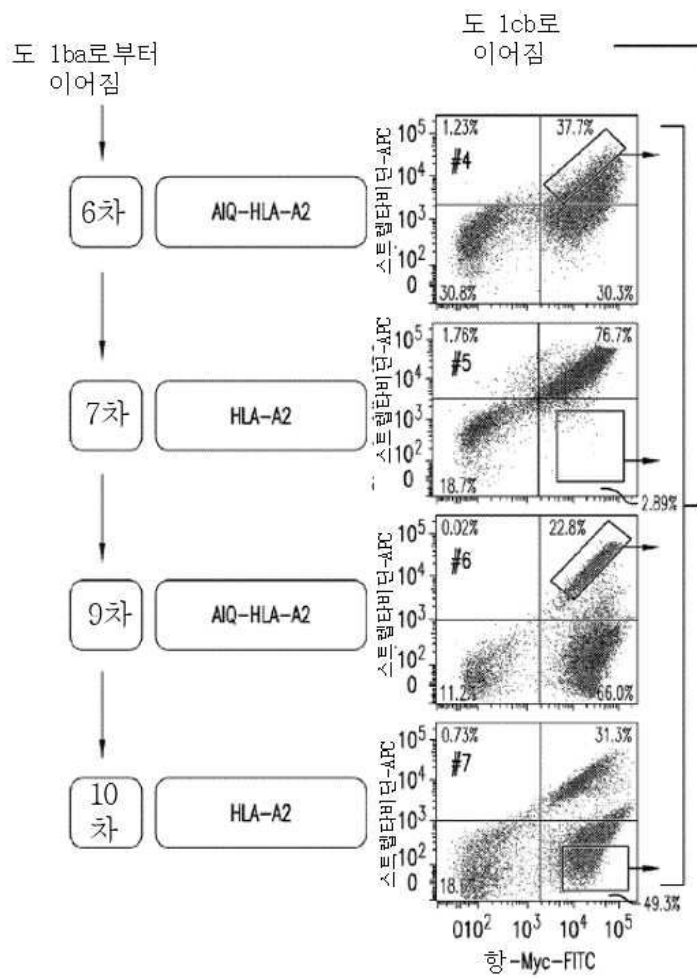
도면 1a



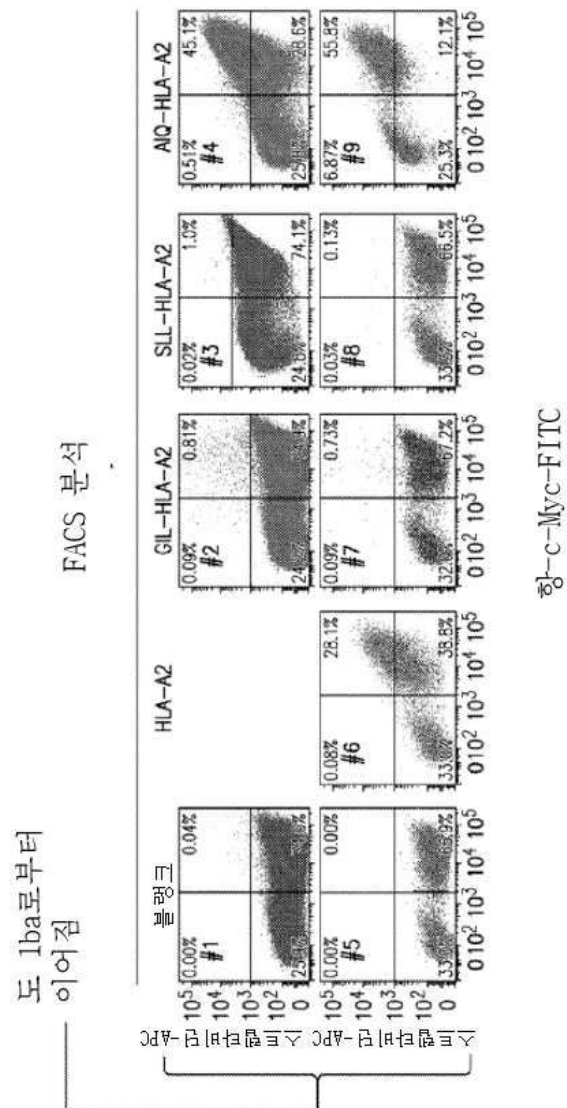
도면 1ba



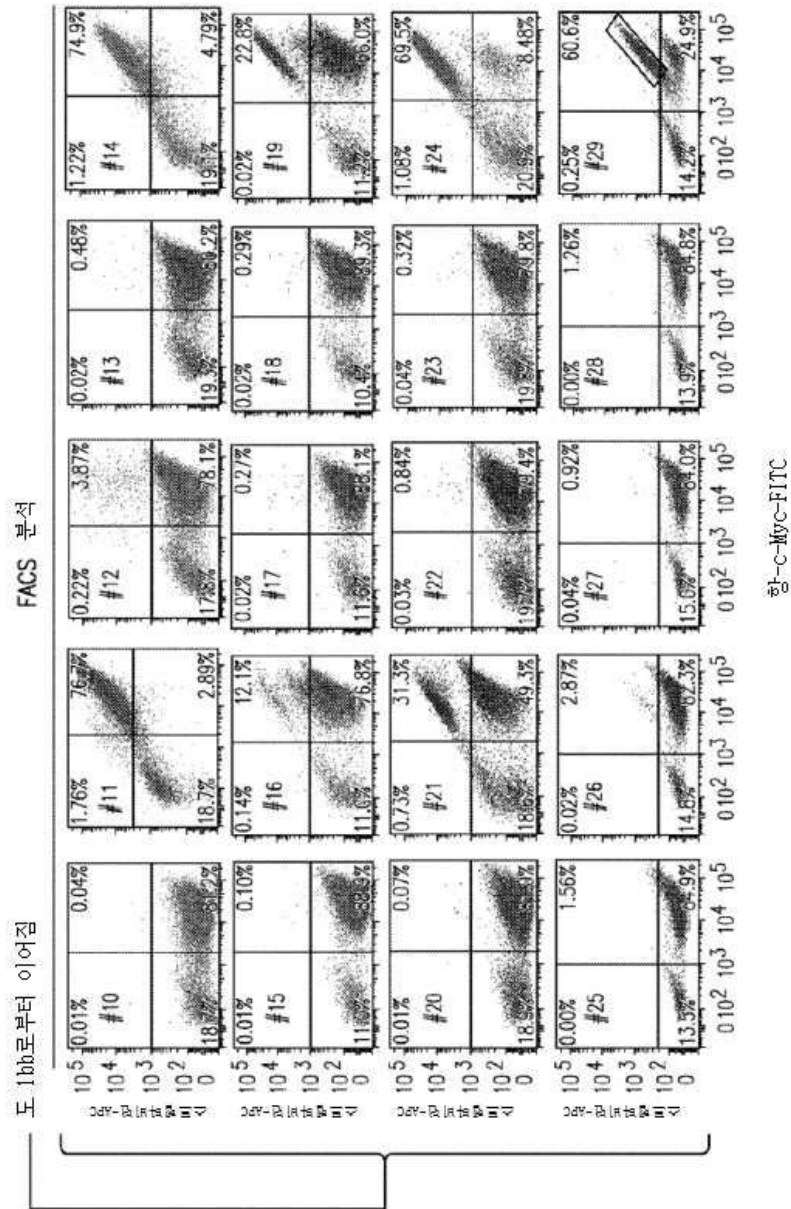
도면 1bb



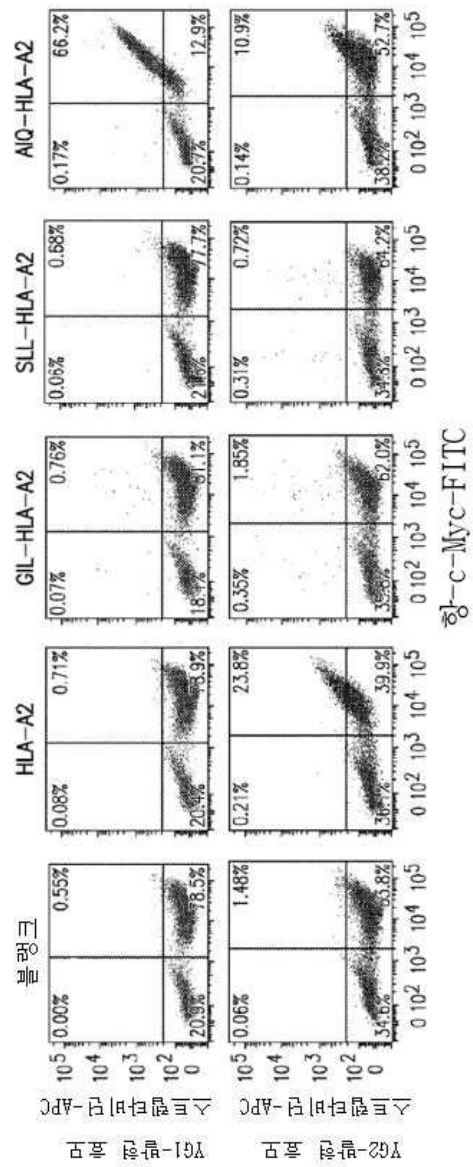
도면 1ca



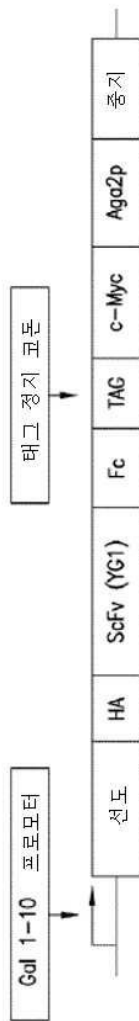
도면1cb



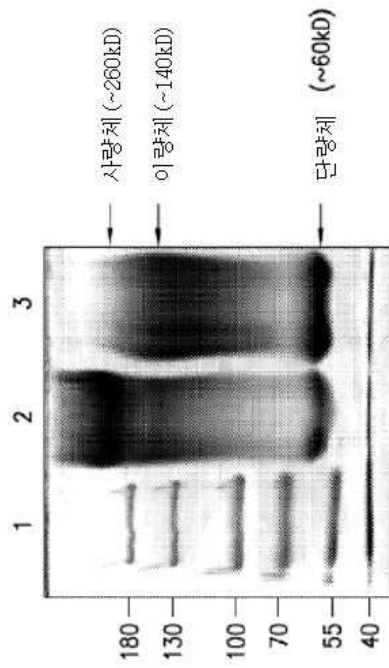
도면1d



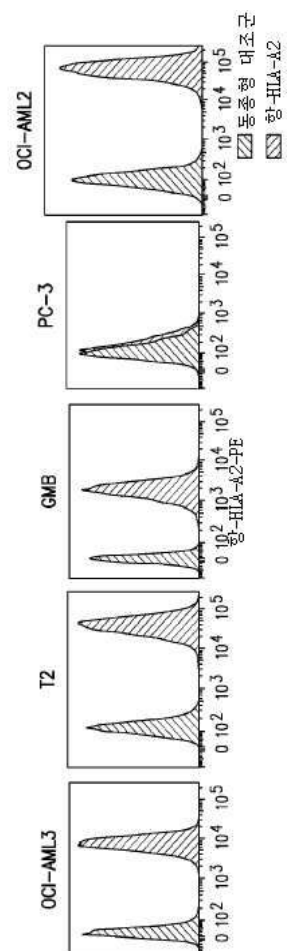
도면2a



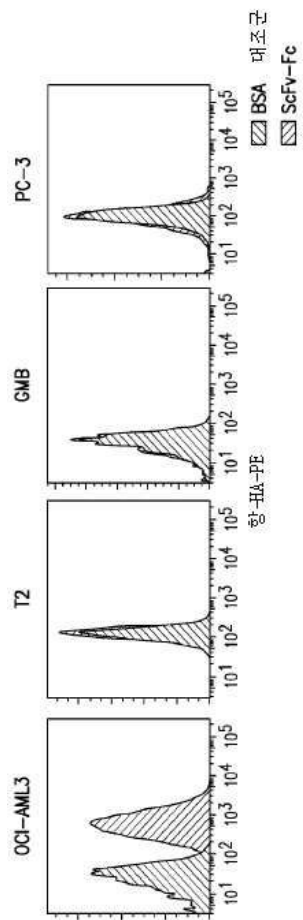
도면2b



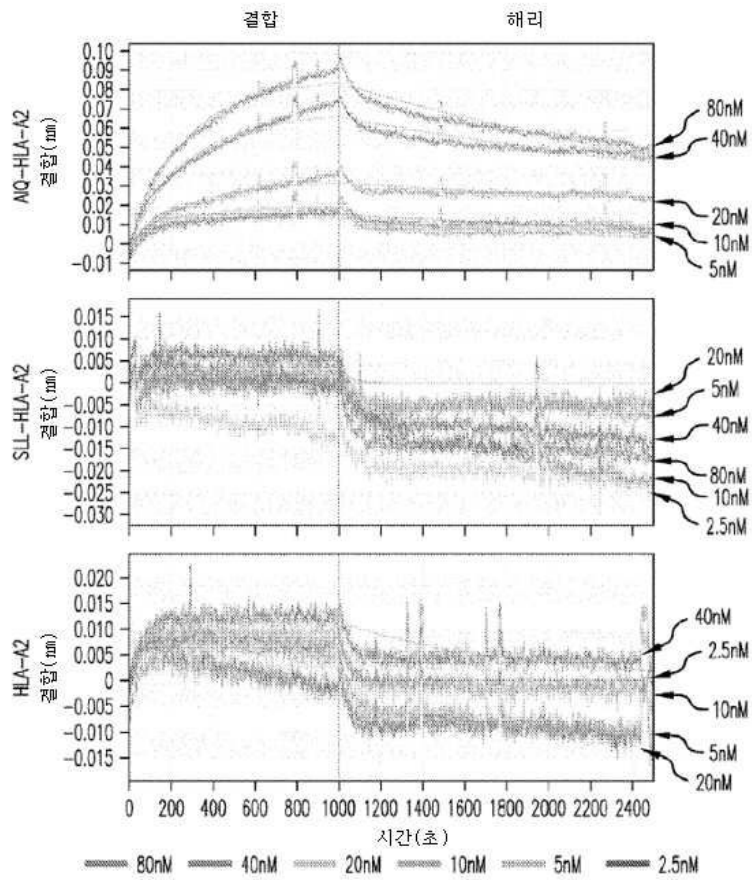
도면2c



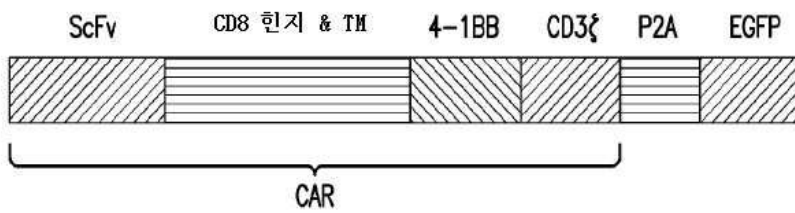
도면2d



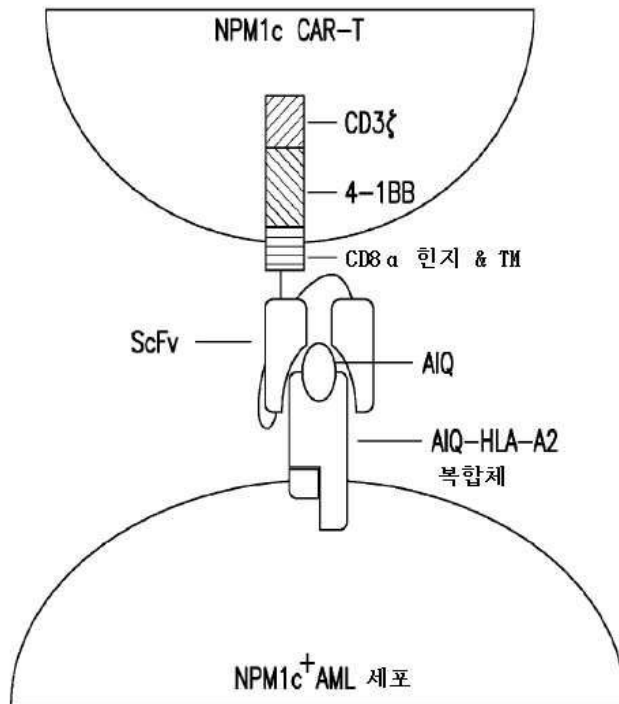
도면2e



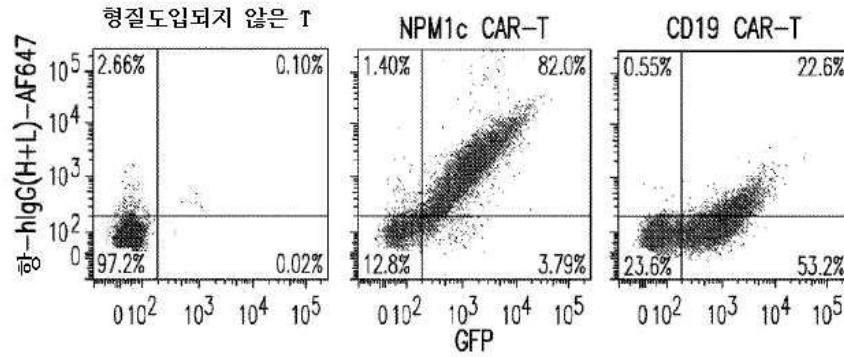
도면3a



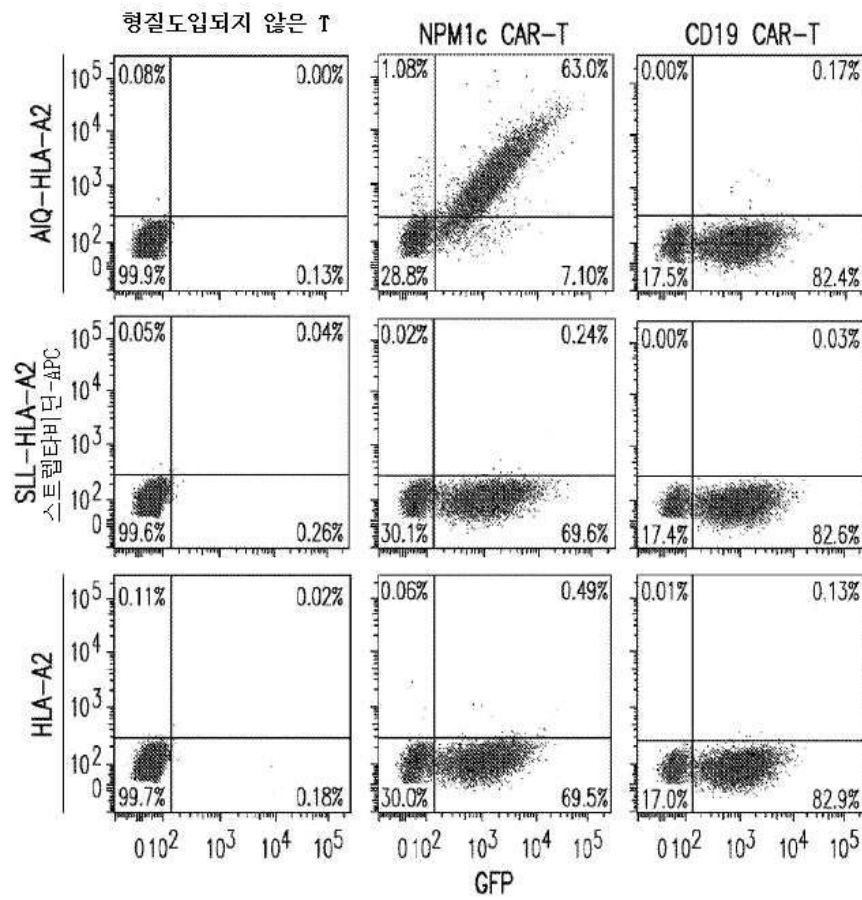
도면3b



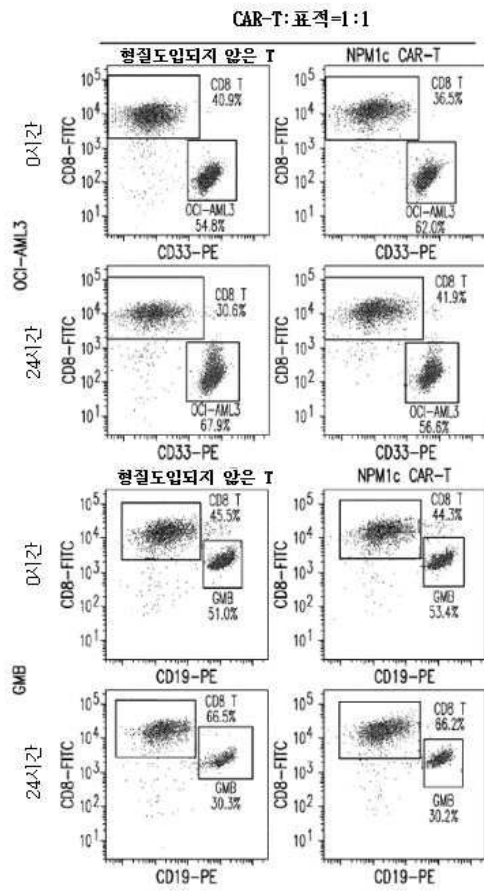
도면3c



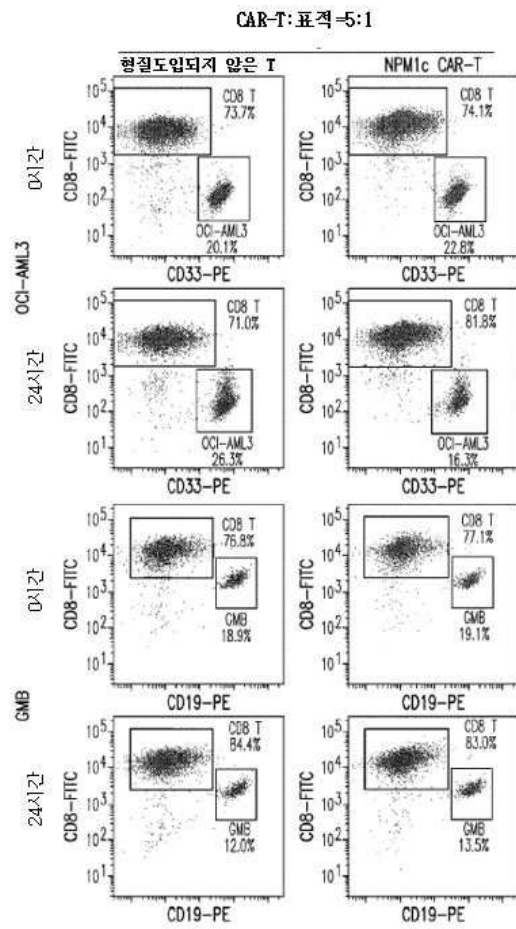
도면3d



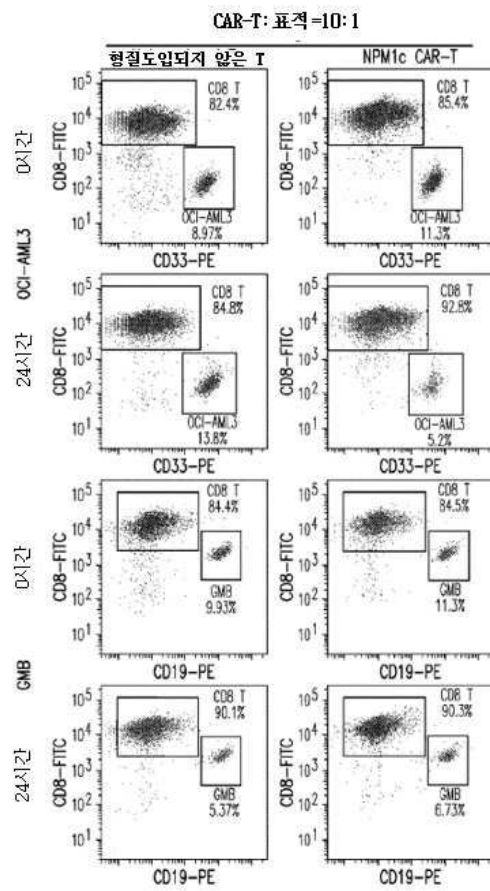
도면4aa



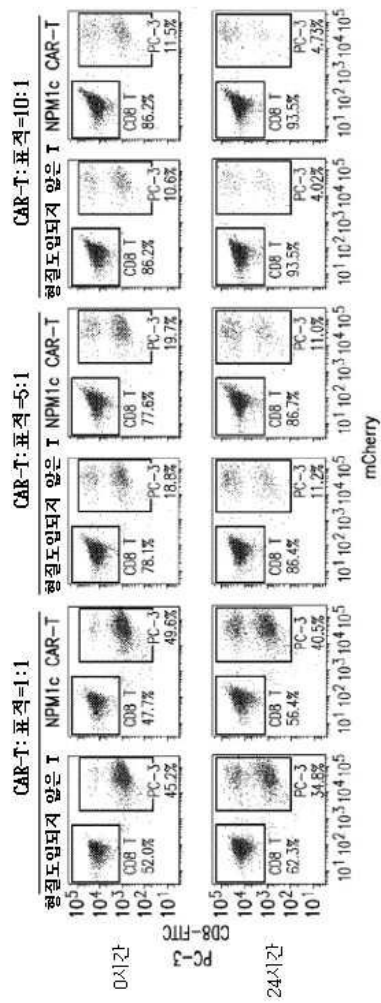
도면4ab



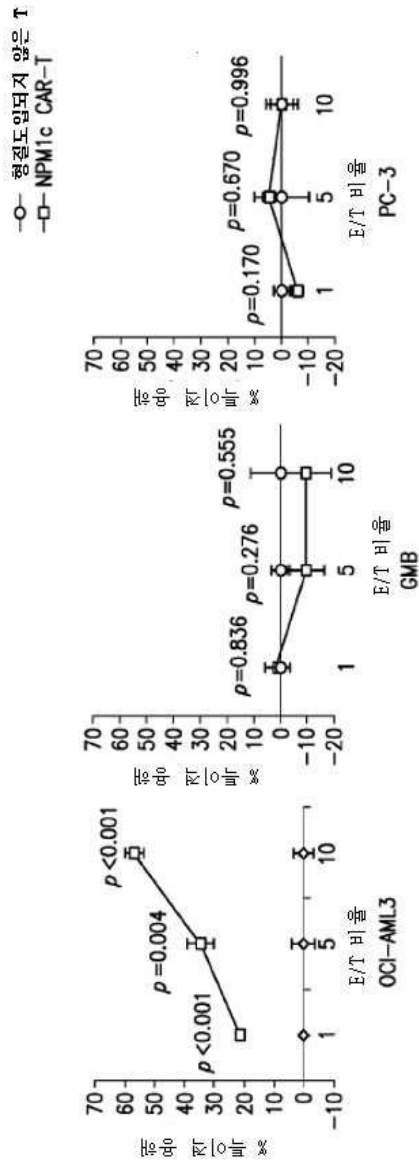
도면4ac



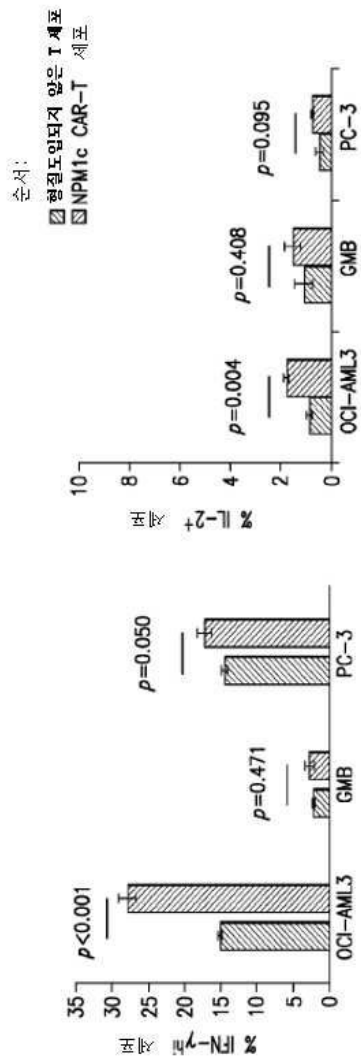
도면4ad



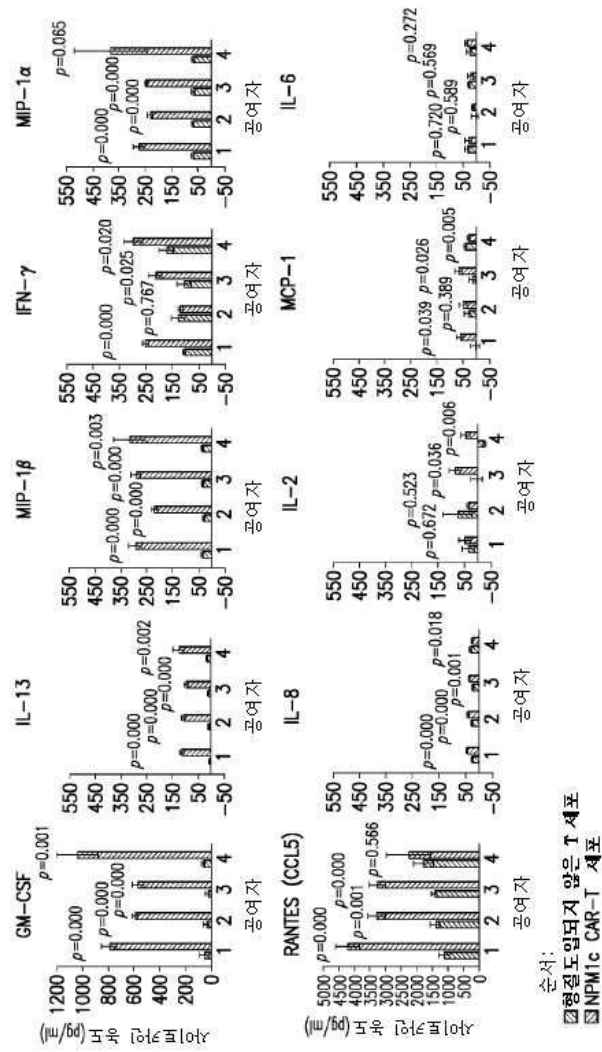
도면4b



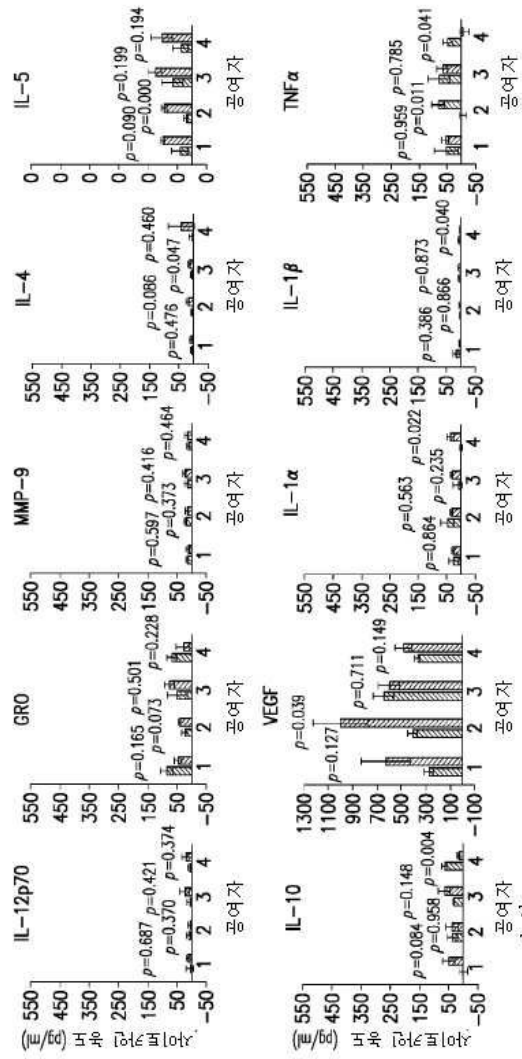
도면4c



도면4da

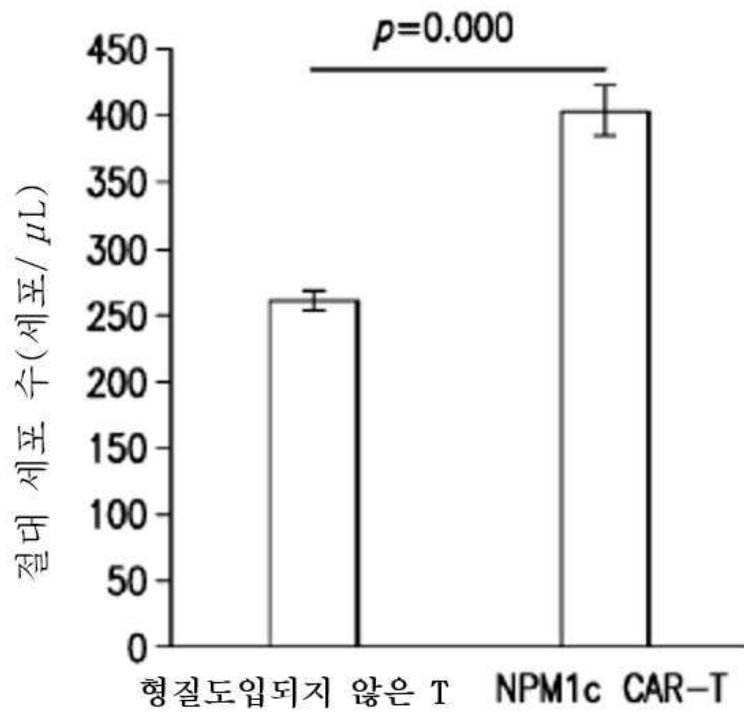


도면4db

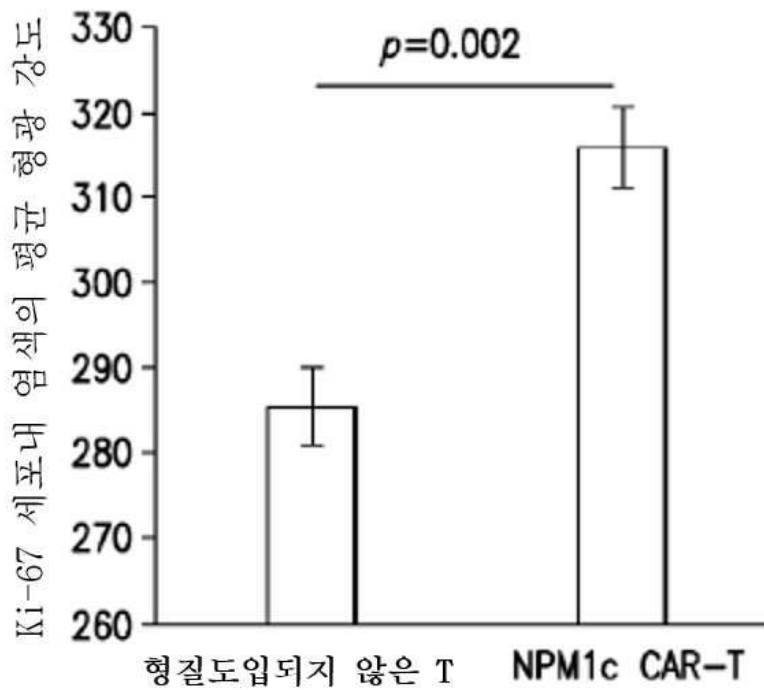


순서 :
□ 형질도입되지 않은 T 세포
▨ NPM1c CAR-T 세포

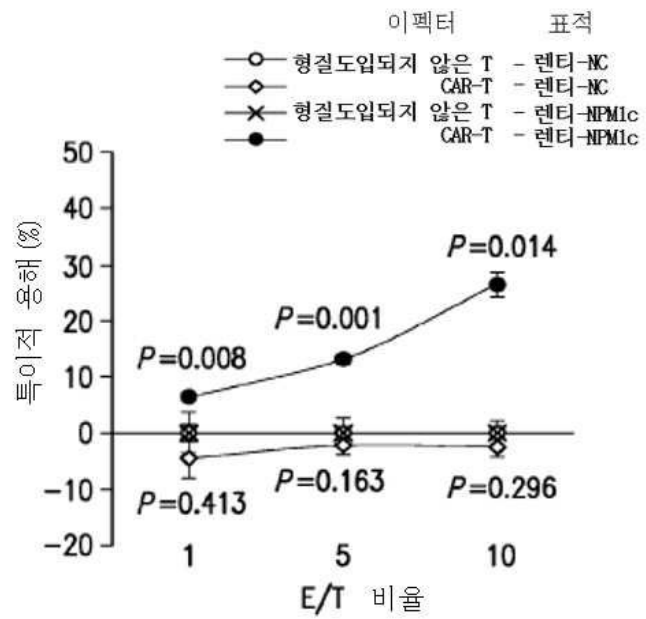
도면4e



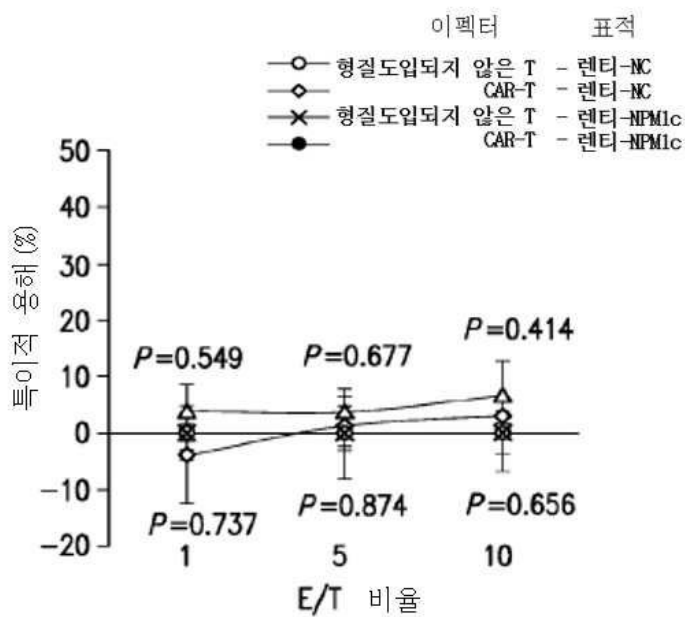
도면4f



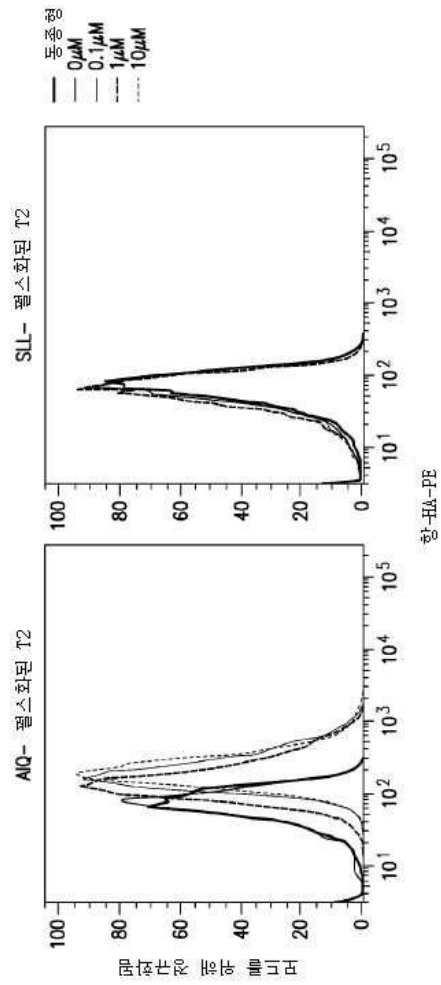
도면4g



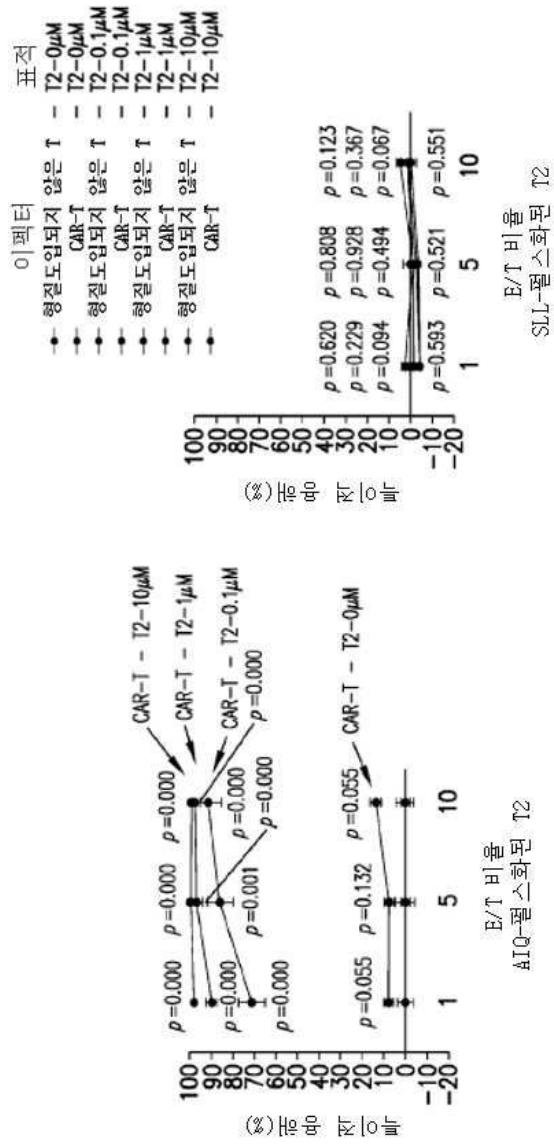
도면4h



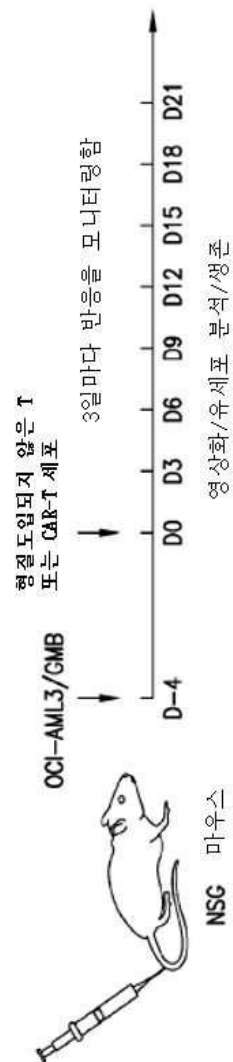
도면4i



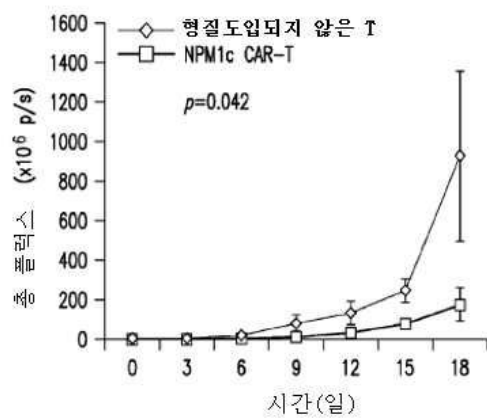
도면4j



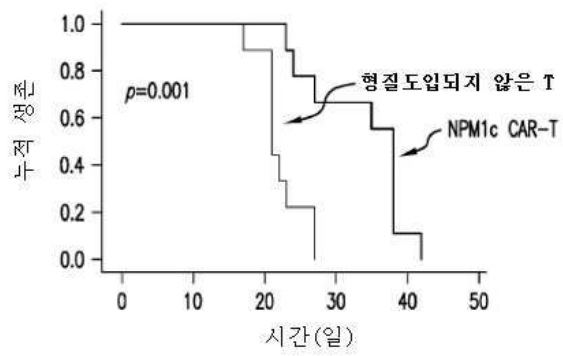
도면5a



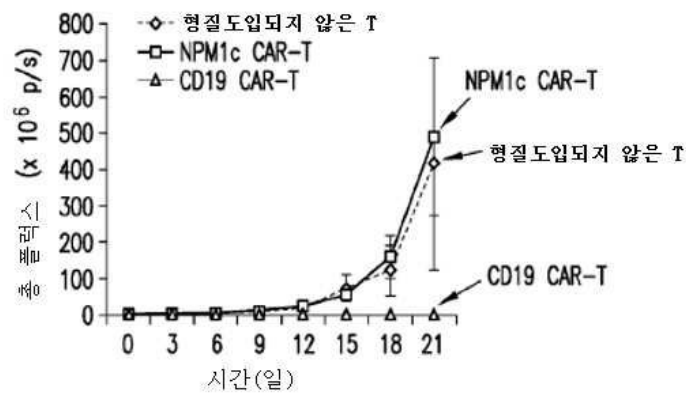
도면5b



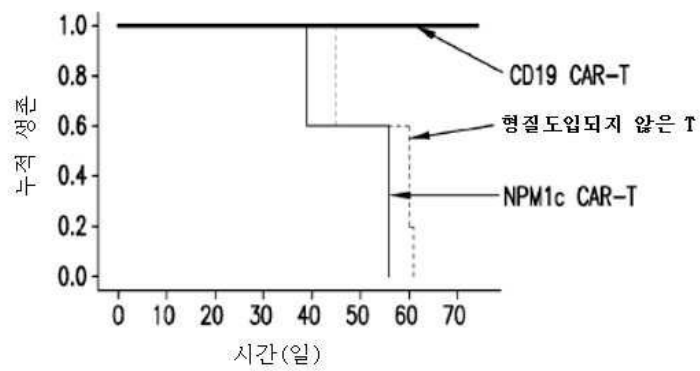
도면5c



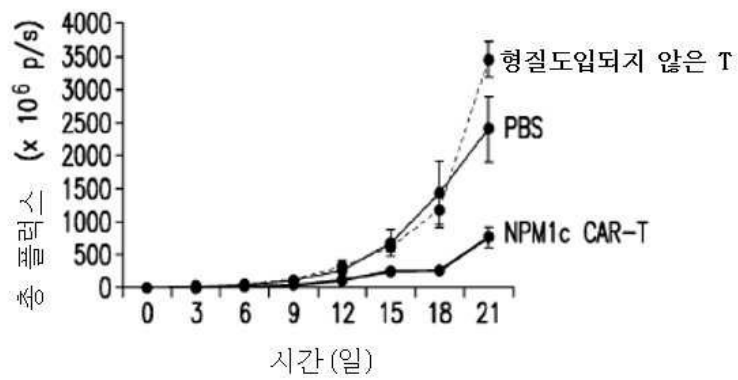
도면5d



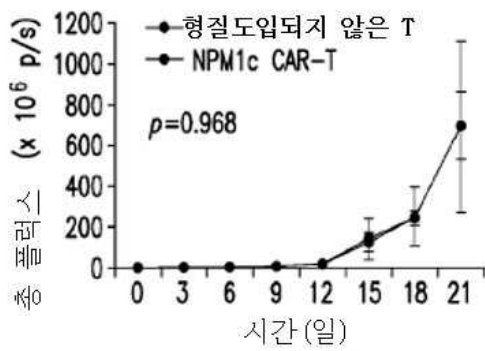
도면5e



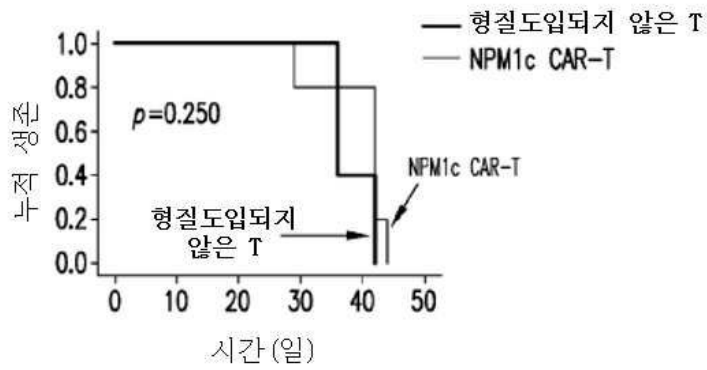
도면5f



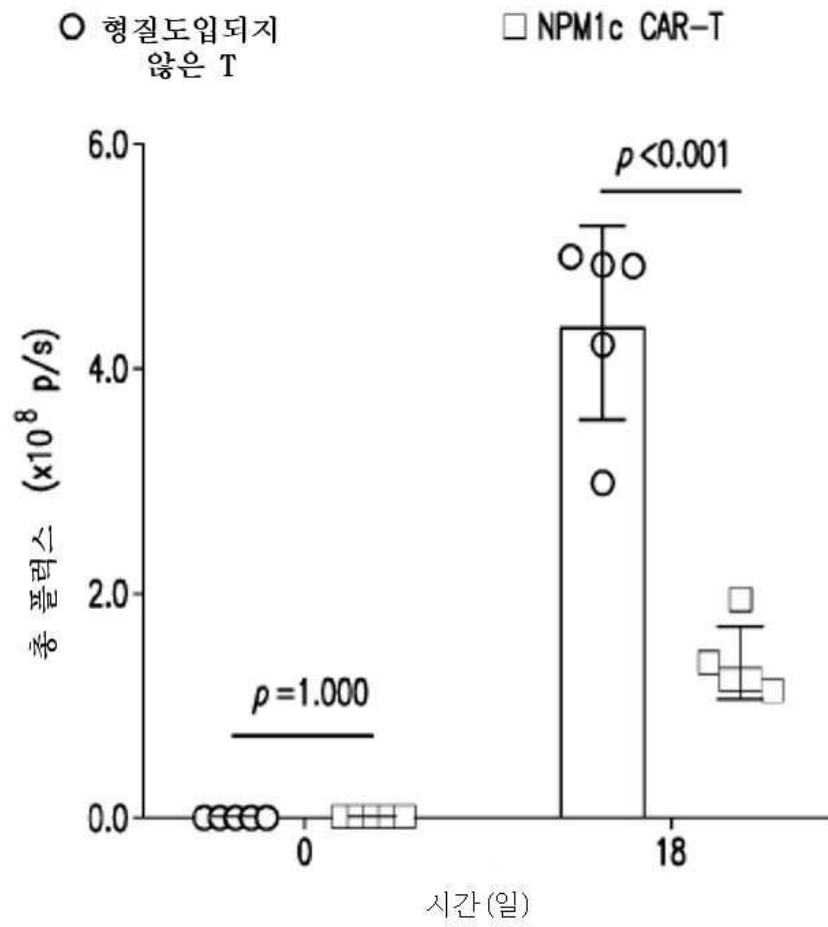
도면5g



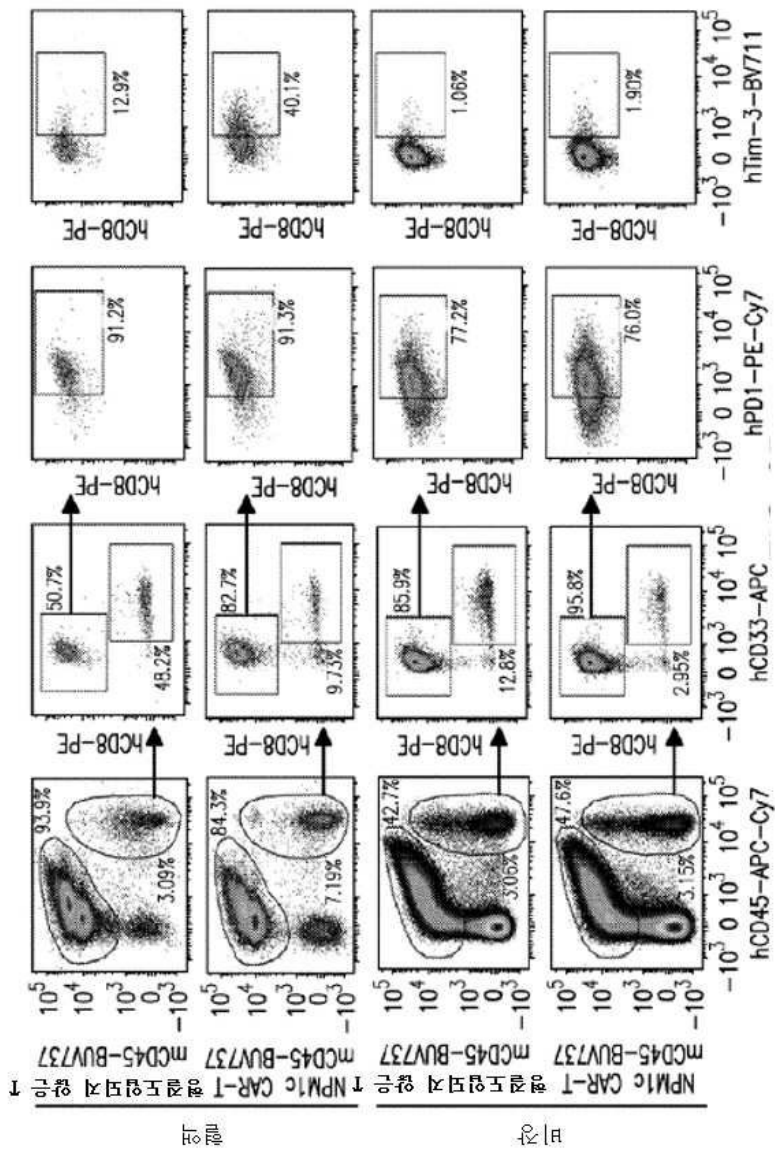
도면5h



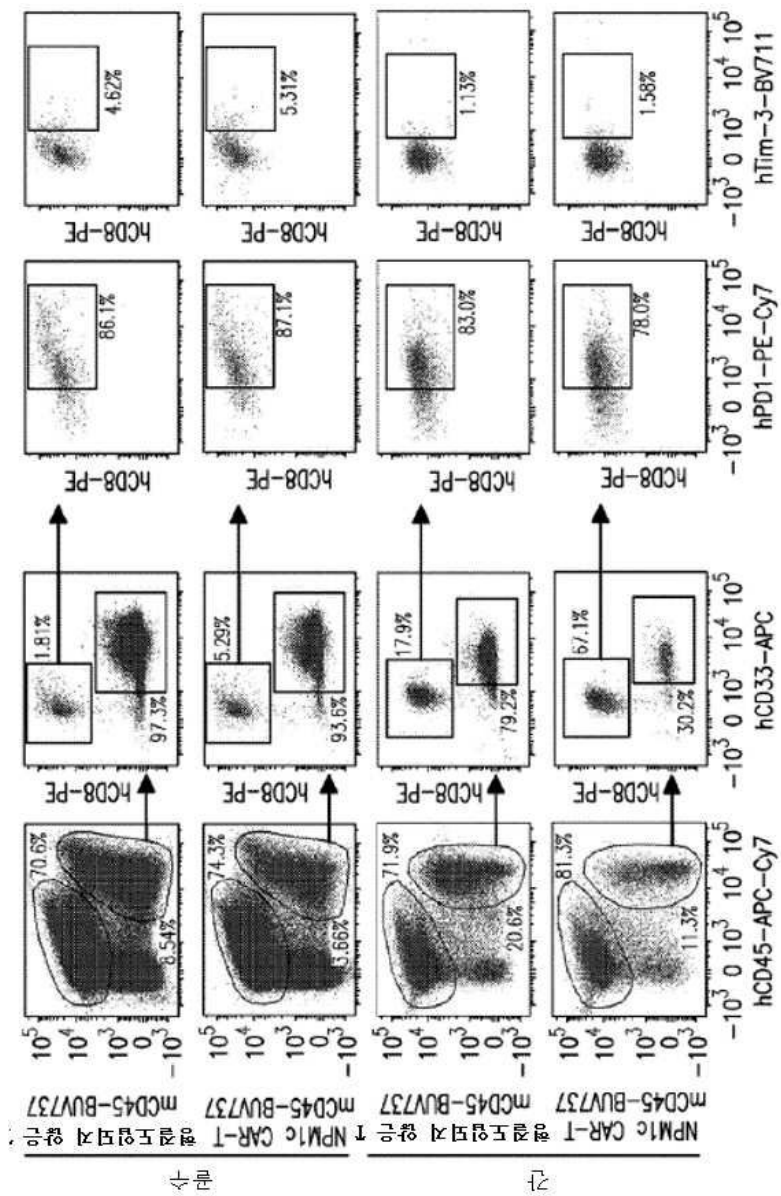
도면6a



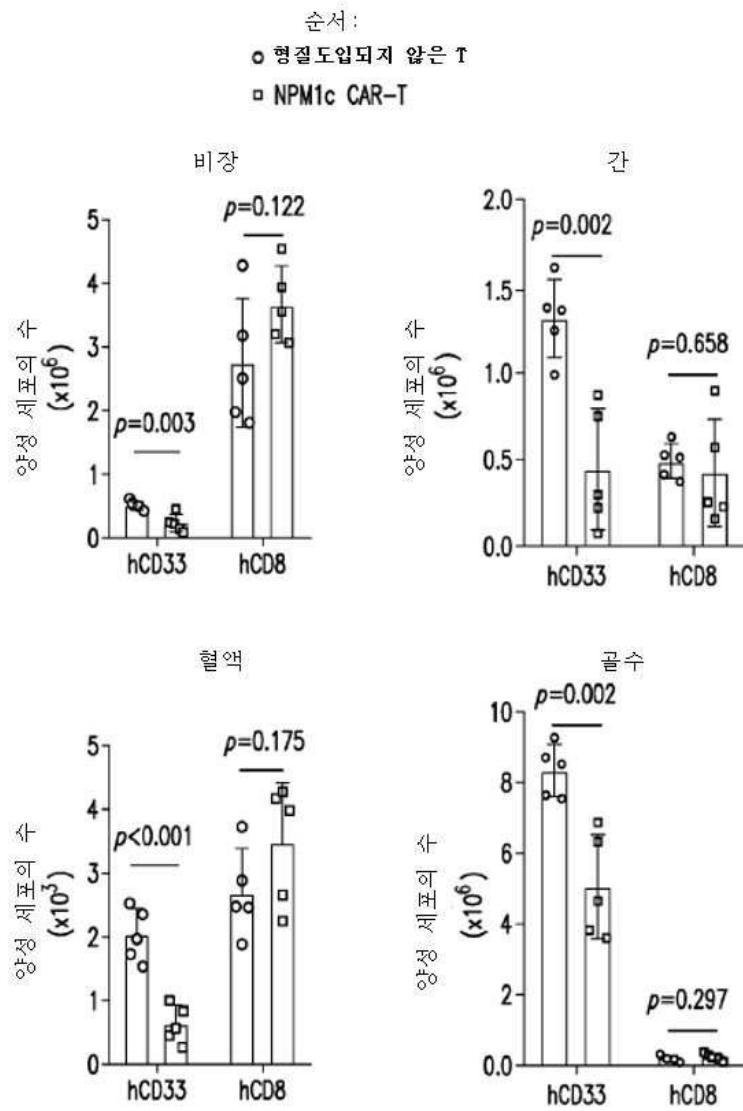
도면6b



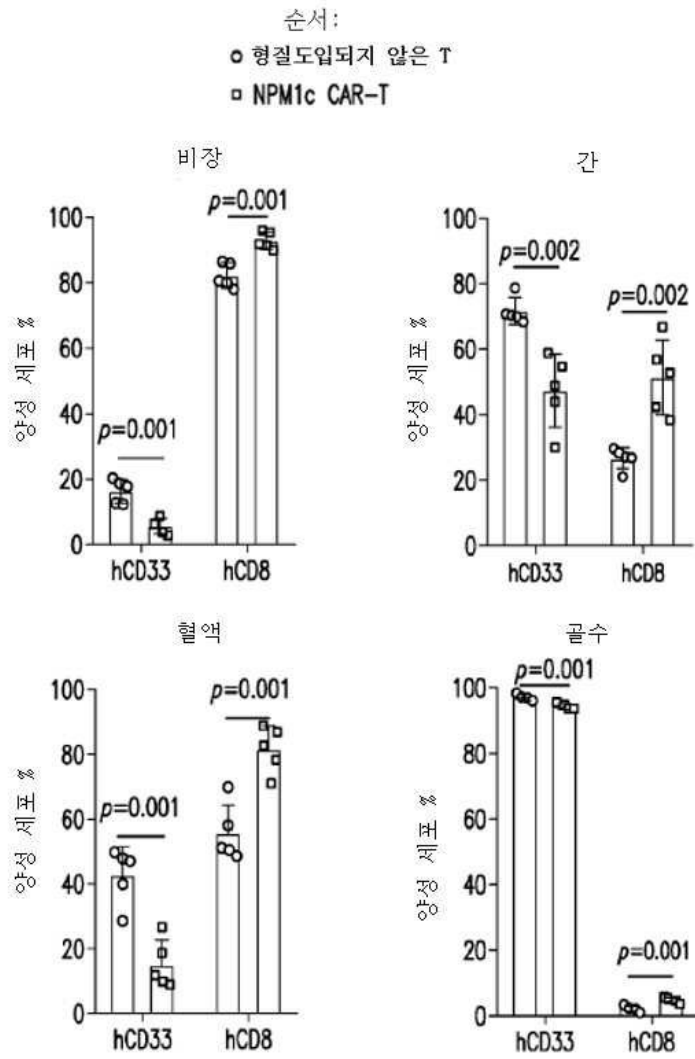
도면6c



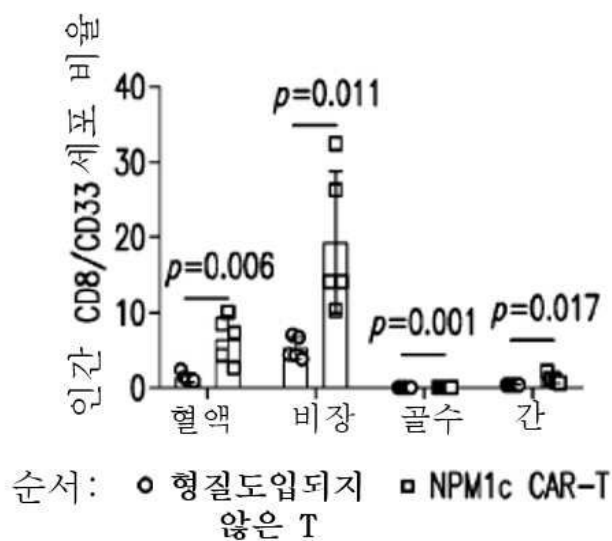
도면6d



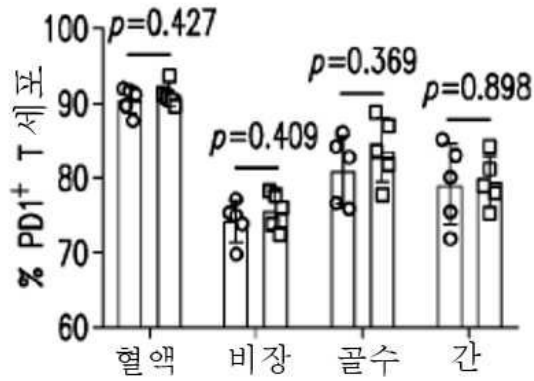
도면6e



도면6f

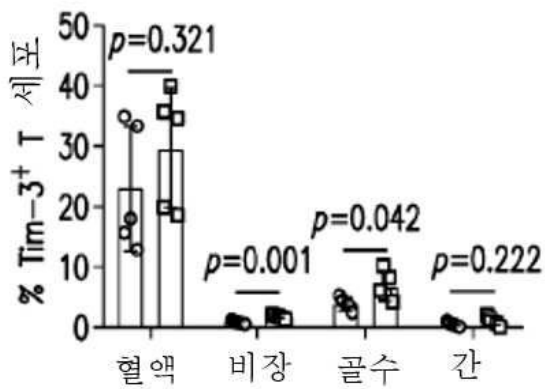


도면6g



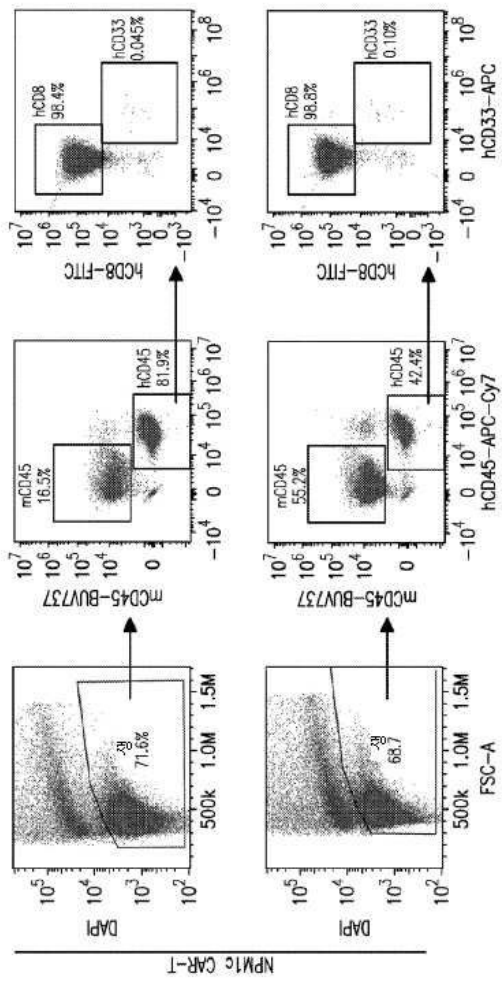
순서: ○ 형질도입되지 않은 T □ NPM1c CAR-T

도면6h

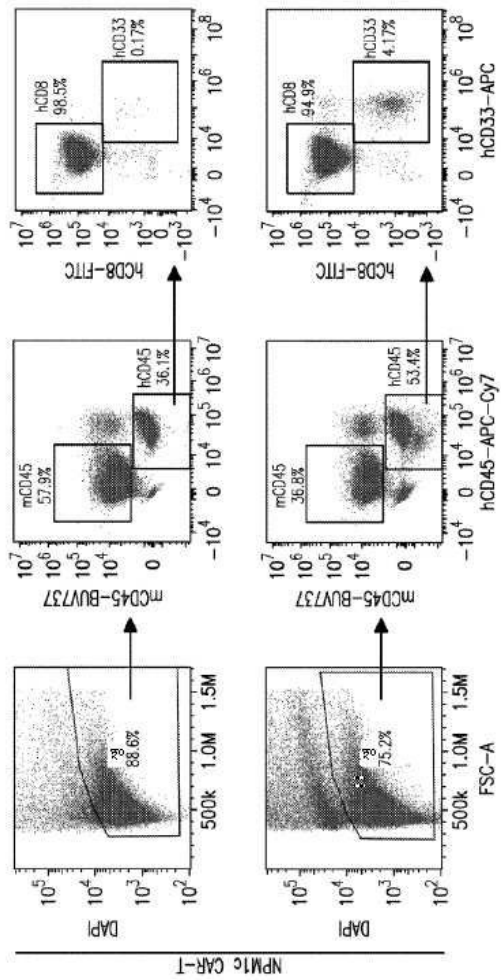


순서: ○ 형질도입되지 않은 T □ NPM1c CAR-T

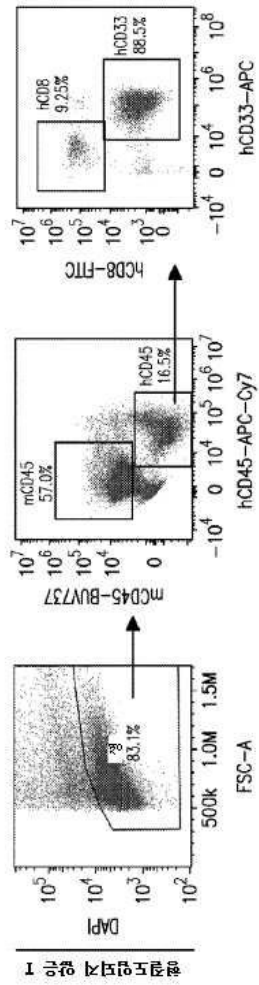
도면6ia



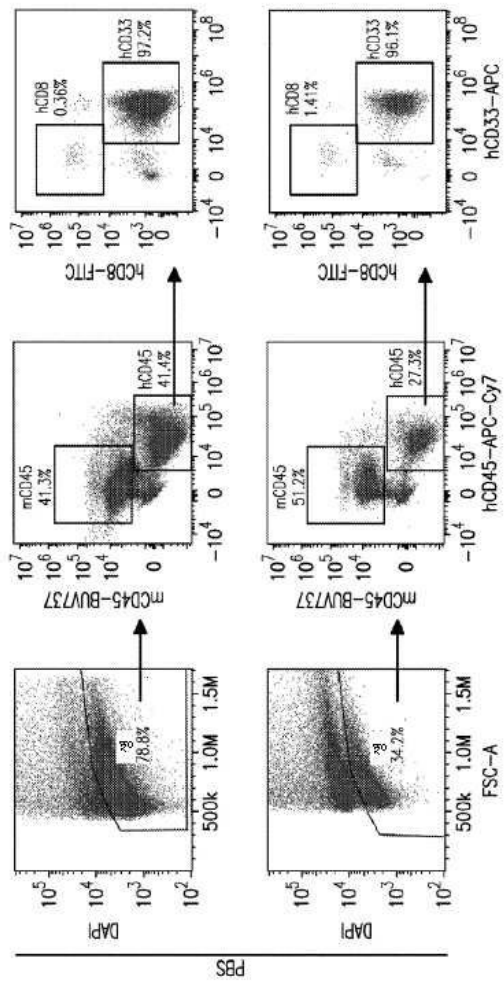
도면6ib



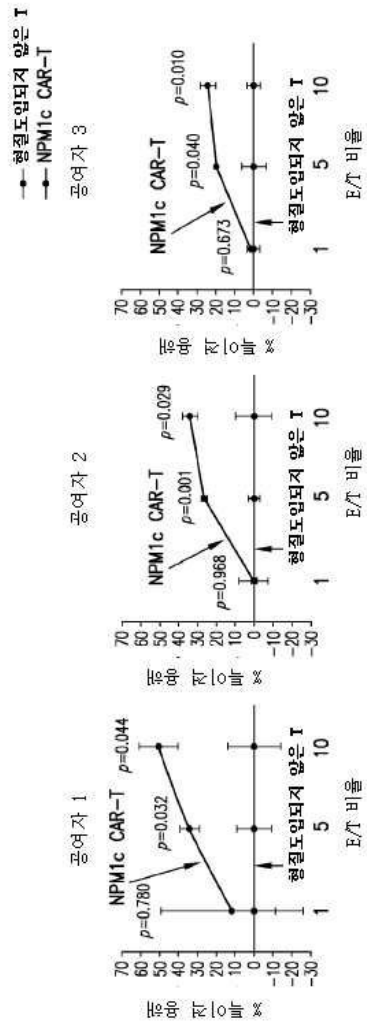
도면6ic



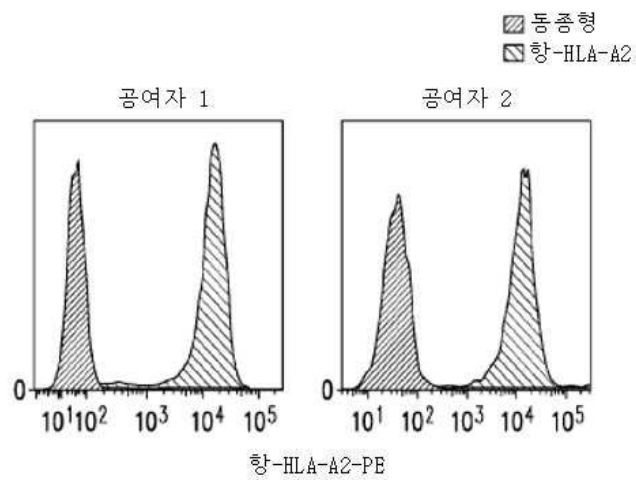
도면6id



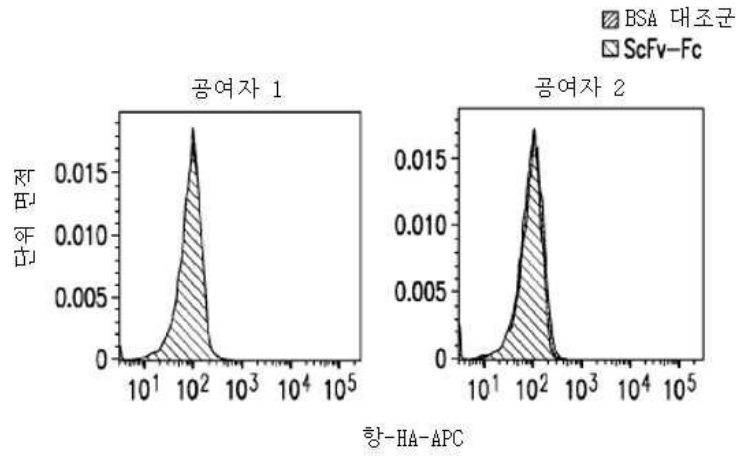
도면7a



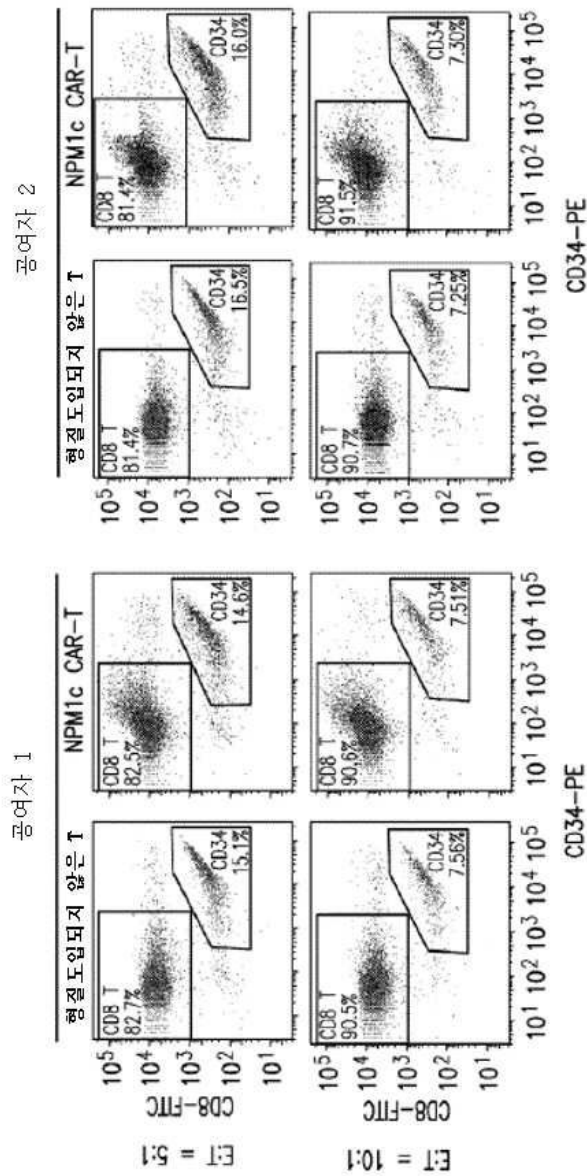
도면7b



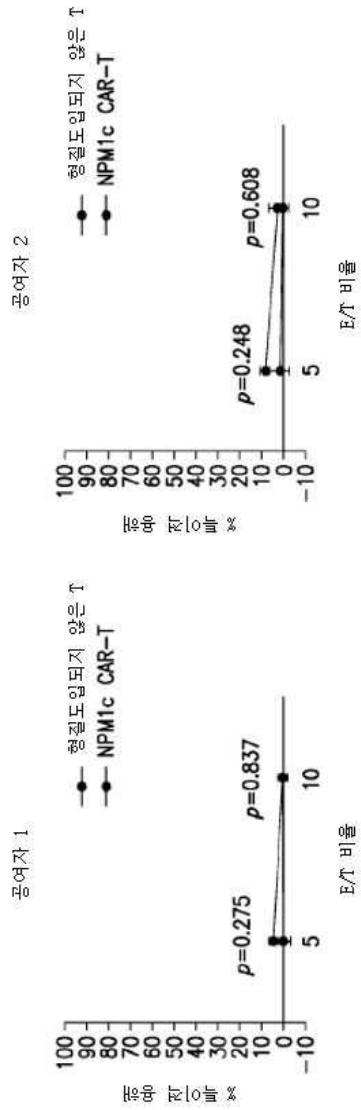
도면7c



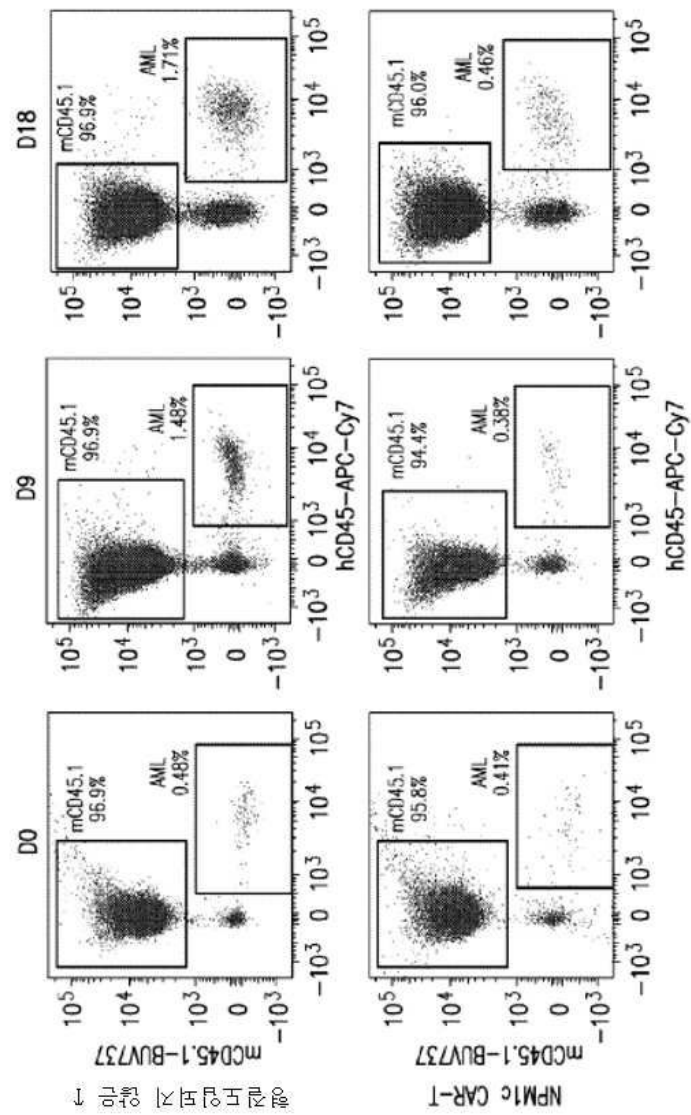
도면7d



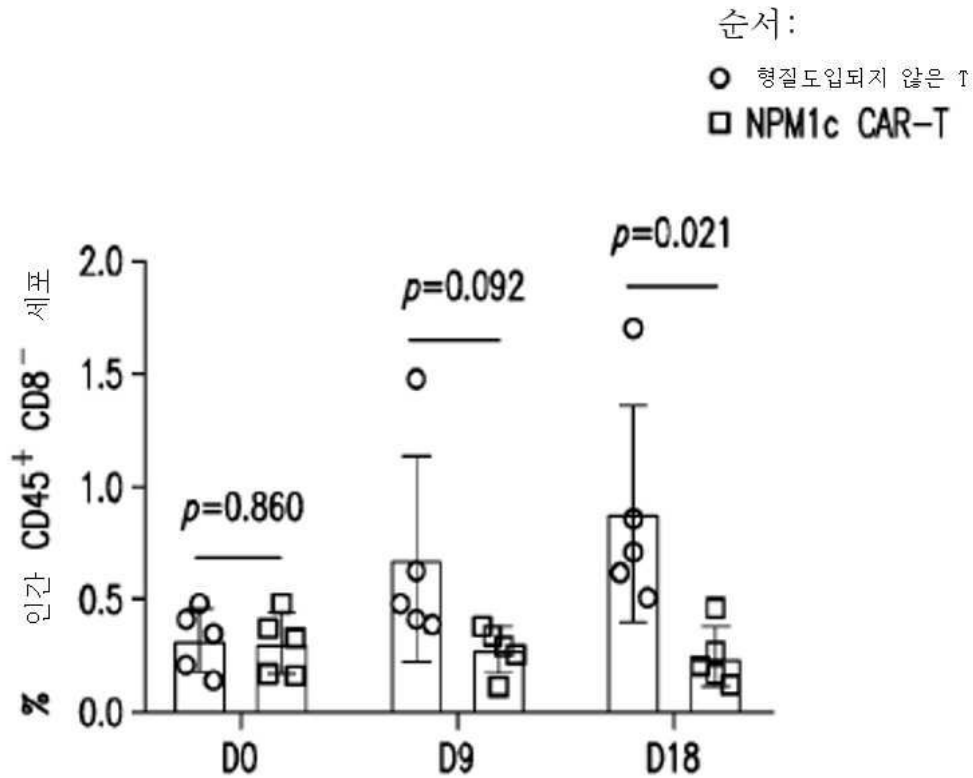
도면7e



도면7f



도면7g



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMMUNOTHERAPY OF NPM1c-POSITIVE
CANCER

<130> MITN-057PC

<140> PCT/US2021/012701

<141> 2021-01-08

<150> US 62/987,612

<151> 2020-03-10

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Leukemia-specific neoantigen epitope of NPM1c

<400> 1

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv amino acid sequence

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Ile Leu Gly

100 105 110

Thr Thr Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu

115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser

130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

165 170 175

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
180 185 190
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
195 200 205
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220
Arg Leu Gly Tyr Pro Thr Thr Thr Leu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL amino acid sequence

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Ile Leu Gly

100 105 110
Thr Thr Ala Ala
115

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv linker amino acid sequence

<400> 4

Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ser Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH amino acid sequence

<400> 5

Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

20 25 30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Pro Thr Thr Thr Leu Leu Pro Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR1 amino acid sequence (IMGT)

<400> 6

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR2 amino acid sequence (IMGT)

<400> 7

Ala Ala Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR3 amino acid sequence (IMGT)

<400> 8

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR1 amino acid sequence (IMGT)

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR2 amino acid sequence (IMGT)

<400> 10

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR3 amino acid sequence (IMGT)

<400> 11

Ala Arg Leu Gly Tyr Pro Thr Thr Thr Leu Leu Pro Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 12

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv nucleic acid sequence

<400> 12

gacatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaatcaa atccggaatt ctaggtacta ctgccgctag tggtagtagt 360

ggtggcagta gcagtggcgc cgaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg ctgtgtacag 420

cctggggggt cctgagact ctctgtgca gcctctggat tcacctttag cagctatgcc 480

atgagctggg tccgccagc tccaggaag gggctggagt gggtctcagc tattagtgtt 540

agtgggtgta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac 600

aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgtg 660

tattactgtg cgaggctggg ttacctact actacctac taccctttga ttactggggc 720

caaggtaccc tggctactgt ctccagt 747

<210> 13

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL nucleic acid sequence

<400> 13

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa atccggaatt ctaggtacta ctgccgct 348

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv linker nucleic acid sequence

<400> 14

agtggtagta gtggtggcag tagcagtgg 30

<210> 15

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH nucleic acid sequence

<400> 15

gccgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga 60

ctctctgtg cagcctctgg attcaccttt agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag 120

gctccaggga aggggctgga gtgggtctca gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac 180

tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 240

tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tgtattactg tgcgaggctg 300

ggttacccta ctactaccct actacccttt gattactggg gccaaggtac cctggtcact 360

gtctccagt 369

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR1 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 16

cagagcatta gcagctat 18

<210> 17

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR2 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 17

gctgcatcc 9

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VL CDR3 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 18

caacagagtt acagtacccc gctcagc 27

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR1 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 19

ggattcacct ttagcagcta tgcc 24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR2 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 20

attagtggta gtggtggttag caca

24

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: YG1 scFv VH CDR3 nucleic acid sequence (IMGT)

<400> 21

gcgaggtctgg gttaccctac tactacccta ctacccttg attac

45

<210> 22

<211> 751

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NPM1c CAR amino acid sequence (with YG1 scFv)

<400> 22

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln

35 40 45

Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser

100 105 110

Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

Ser Gly Ile Leu Gly Thr Thr Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser

130 135 140

Ser Ser Gly Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

145 150 155 160

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

165 170 175

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr

195 200 205

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

210 215 220

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Pro Thr Thr Thr Leu Leu Pro

245 250 255

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr

260 265 270

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

275 280 285

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala

290 295 300

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala

305 310 315 320

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr

325 330 335

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

340 345 350

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser

355 360 365

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

370 375 380

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln

385 390 395 400
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

 405 410 415
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 420 425 430
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 435 440 445
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 450 455 460
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

 465 470 475 480
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Ala Thr Asn
 485 490 495
 Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 500 505 510
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 515 520 525
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

 530 535 540
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 545 550 555 560
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 565 570 575
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 580 585 590
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

 595 600 605
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 610 615 620
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 625 630 635 640

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
645 650 655

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

660 665 670
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
675 680 685

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
690 695 700

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
705 710 715 720

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

725 730 735
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
740 745 750

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the leading sequence in the
NPM1c CAR

<400> 23

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 24

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the YG1 scFv in the NPM1c CAR

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Ile Leu Gly
 100 105 110

 Thr Thr Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 145 150 155 160
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175

 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220
 Arg Leu Gly Tyr Pro Thr Thr Thr Leu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 25

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the CD8 hinge and transmembrane regions in the NPM1c CAR

<400> 25

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

35 40 45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys

65

<210> 26

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the 4-1BB signaling domain in the NPM1c CAR

<400> 26

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the CD3-zeta signaling domain
in the NPM1c CAR

<400> 27

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the P2A self-cleaving peptide
in the NPM1c CAR

<400> 28

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 29

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence of the EGFP region in the NPM1c

CAR

<400> 29

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu

195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210	215	220	
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
225	230	235	
<210> 30			
<211> 2265			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic: NPM1c CAR nucleic acid sequence (with YG1 scFv)			
<400> 30			
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttcigtcca cgccgctcgg	60		
cccgacatcc agatgaccca gtctccatcc tccctgtctg catctgtagg agacagagtc	120		
accatcactt gccgggcaag tcagagcatt agcagctatt taaattggta tcagcagaaa	180		
ccagggaag cccctaagct cctgatctat gctgcatcca gtttgcaaag tggggtccca	240		
tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa	300		
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcaa cagagttaca gtaccccgct cacgttcggc	360		
caagggacca aggtggaaat caaatccgga attctaggta ctactgccgc tagtggtagt	420		
agtggtgcca gtagcagtgg tgccgaggtg cagctggtgg agtctggggg aggcttggtg	480		
cagcctgggg ggicccctgag actctcctgt gcagcctctg gattcacctt tagcagctat	540		
gccatgagct gggtcgccca ggctccaggg aaggggctgg agtgggtctc agctattagt	600		
ggtagtgggtg gtagcacata ctacgcagac tccgtgaagg gccggttcac catctccaga	660		
gacaattcca agaacacgct gtatctgcaa atgaacagcc tgagagccga ggacacggcc	720		
gtgtattact gtgcgaggtt gggttaccct actactaccc tactaccctt tgattactgg	780		
ggccaaggtg ccttggtcac tgtctccagt accactaccc cagcacccag gccaccacc	840		
ccggctccta ccatgcctc ccagcctctg tccctgcgtc cggaggcatg tagaccgca	900		
gctgggtggg ccgtgcatac ccggggctct gacttcgcct gcgatatcta catttgggcc	960		
cctctggctg gtacttgccg ggtcctgctg ctttactcg tgatcactct ttactgtaag	1020		
cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaaccct tcatgaggcc tgtgcagact	1080		
actcaagagg aggacggctg ttcatgccgg ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa	1140		
ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct acaagcaggg gcagaaccag	1200		
ctctacaacg aactcaatct tggctcgaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga	1260		
ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg cgagaaaaga atccccaaga gggcctgtac	1320		
aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa	1380		

cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440

acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg ccgcctcggg gatccggcgc aacaaacttc 1500

tctctgctga aacaagccgg agatgtcgaa gagaatcctg gaccgatggt gagcaagggc 1560

gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccac cttggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc 1620

cacaagtcca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 1680

aagttcatct gcaccaccgg caagetgcc gtgccctggc ccaccctgt gaccaccctg 1740

acctacggcg tgcagtgttt cagccgtac cccgaccaca tgaagcagca cgacttttc 1800

aagtcgccca tgcccgaagg ctacgtccag gacgcacca ttttcttcaa ggacgacggc 1860

aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtgc gagggcgaca ccttggtgaa ccgcatcgag 1920

ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggacacaagct ggagtacaac 1980

tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac 2040

ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 2100

aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcacccag 2160

tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgt ggagttcgtg 2220

accgccgcgg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtga 2265

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the leading sequence in the NPM1c CAR

<400> 31

atggccctcc ctgtcaccgc cctgtgtgtt ccgtggctc ttctgtcca cgccgtcgg 60

ccc 63

<210> 32

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the YG1 scFv in the NPM1c CAR

<400> 32

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac gttcgcccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa atccggaatt ctaggtacta ctgccgctag tggtagtagt 360
 ggtggcagta gcagtgggct cgaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg ctggtacag 420
 cctgggggtt cctgagact ctctgtgca gcctctggat tcacctttag cagctatgcc 480

atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt gggctctcagc tattagtgg 540
 agtggtggtg gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac 600
 aattccaaga acacgtgtg tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgtg 660
 tattactgtg cgaggtggg ttacctact actacctac tacccttga ttactggggc 720
 caaggtaccc tggctactgt ctccagt 747

<210> 33

<211> 207

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the CD8 hinge and

transmembrane regions in the NPM1c CAR

<400> 33

accactaccc cagcaccgag gccacccacc ccggctccta ccatcgctc ccagcctctg 60
 tccctgcgtc cggaggcatg tagaccgca gctgggtggg ccgtgcatac ccgggtctt 120
 gacttcgct gcgatatcta catttgggcc cctctggctg gtacttgcgg ggtcctgctg 180
 ctttactcgt tgatcactct ttactgt 207

<210> 34

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the 4-1BB signaling domain in

the NPM1c CAR

<400> 34

aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc ttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag 60
 actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc cggttcccag aggaggagga aggcggctgc 120

gaactg 126

<210> 35

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the CD3-zeta signaling domain
in the NPM1c CAR

<400> 35

cgcgtgaaat tcagccgcag cgcagatgct ccagcctaca agcaggggca gaaccagctc 60

tacaacgaac tcaatcttgg tcggagagag gactacgacg tgctggacaa gcggagagga 120

cgggaccag aaatgggcgg gaagccgcgc agaaagaatc cccaagaggg cctgtacaac 180

gagctccaaa aggataagat ggcagaagcc tatagcgaga ttggtatgaa aggggaacgc 240

agaagaggca aaggccacga cggactgtac cagggactca gcaccgccac caaggacacc 300

tatgacgctc ttcacatgca ggccctgccg cctcgg 336

<210> 36

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the P2A self-cleaving peptide
in the NPM1c CAR

<400> 36

gcaacaaact tctctctgct gaaacaagcc ggagatgtcg aagagaatcc tggaccg 57

<210> 37

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Nucleic acid sequence of the EGFP region in the NPM1c
CAR

<400> 37

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatcgcgcc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggcccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca ccagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtga 720

<210> 38

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(330)

<223> Human IgG1

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 39
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(326)

<223> Human IgG4 (terminal K absent)

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 40

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(326)

<223> Human IgG4 single mutant (S228P) (terminal K absent)

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly

325

<210> 41

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(326)

<223> Human IgG4 double mutant (S228P) (L235E) (terminal K absent)

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 42

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

><221> misc_feature

<222> (1)..(326)

<223> Human IgG4 double mutant (S228P) (L235A) (terminal K absent)

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

 Glu Phe Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 43

<211> 297

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD20 amino acid sequence

<400> 43

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15
Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg

20 25 30
Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile

85 90 95
Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro

145 150 155 160
Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175
Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
 180 185 190
Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
 195 200 205
Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys

210 215 220
Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240
Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255
Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270
Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser

275 280 285
Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro

290 295

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FLAG

<400> 44

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: polyhistidine (6-His)

<400> 45

His His His His His His

1 5

<210> 46

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: hemagglutinin (HA)

<400> 46

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HCDR1.1 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 47

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

1 5 10

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HCDR1.2 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 48

Arg Tyr Thr Met His

1 5

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HCDR2 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 49

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HCDR3 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 50

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LCDR1 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 51

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LCDR2 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 52

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LCDR3 (anti-CD3) amino acid sequence

<400> 53

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 294

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(294)

<223> Human wild type nucleophosmin (amino acid sequence)

<400> 54

Met Glu Asp Ser Met Asp Met Asp Met Ser Pro Leu Arg Pro Gln Asn

1 5 10 15

Tyr Leu Phe Gly Cys Glu Leu Lys Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys

20 25 30

Val Asp Asn Asp Glu Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg Thr Val Ser

35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Lys Asp Glu Leu His Ile Val Glu Ala Glu Ala

50 55 60

Met Asn Tyr Glu Gly Ser Pro Ile Lys Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys

65 70 75 80

Met Ser Val Gln Pro Thr Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ile Thr Pro

85 90 95

Pro Val Val Leu Arg Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Val His Ile Ser

100 105 110

Gly Gln His Leu Val Ala Val Glu Glu Asp Ala Glu Ser Glu Asp Glu

115 120 125

Glu Glu Glu Asp Val Lys Leu Leu Ser Ile Ser Gly Lys Arg Ser Ala

130 135 140

Pro Gly Gly Gly Ser Lys Val Pro Gln Lys Lys Val Lys Leu Ala Ala

145 150 155 160

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Asp

165 170 175

Asp Asp Asp Asp Phe Asp Asp Glu Glu Ala Glu Glu Lys Ala Pro Val
180 185 190
Lys Lys Ser Ile Arg Asp Thr Pro Ala Lys Asn Ala Gln Lys Ser Asn
195 200 205
Gln Asn Gly Lys Asp Ser Lys Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys Gly
210 215 220
Gln Glu Ser Phe Lys Lys Gln Glu Lys Thr Pro Lys Thr Pro Lys Gly
225 230 235 240
Pro Ser Ser Val Glu Asp Ile Lys Ala Lys Met Gln Ala Ser Ile Glu
245 250 255
Lys Gly Gly Ser Leu Pro Lys Val Glu Ala Lys Phe Ile Asn Tyr Val
260 265 270
Lys Asn Cys Phe Arg Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Trp

275 280 285
Gln Trp Arg Lys Ser Leu

290

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> C-terminus of human wild type nucleophosmin (amino acid
sequence)

<400> 55

Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Trp Gln Trp Arg Lys Ser

1 5 10 15

Leu

<210> 56

<211> 298

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(298)

<223> Human nucleophosmin encoded by mutant NPM1c gene (amino acid sequence)

<400> 56

Met Glu Asp Ser Met Asp Met Asp Met Ser Pro Leu Arg Pro Gln Asn

1 5 10 15

Tyr Leu Phe Gly Cys Glu Leu Lys Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys

20 25 30

Val Asp Asn Asp Glu Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg Thr Val Ser

35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Lys Asp Glu Leu His Ile Val Glu Ala Glu Ala

50 55 60

Met Asn Tyr Glu Gly Ser Pro Ile Lys Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys

65 70 75 80

Met Ser Val Gln Pro Thr Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ile Thr Pro

85 90 95

Pro Val Val Leu Arg Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Val His Ile Ser

100 105 110

Gly Gln His Leu Val Ala Val Glu Glu Asp Ala Glu Ser Glu Asp Glu

115 120 125

Glu Glu Glu Asp Val Lys Leu Leu Ser Ile Ser Gly Lys Arg Ser Ala

130 135 140

Pro Gly Gly Gly Ser Lys Val Pro Gln Lys Lys Val Lys Leu Ala Ala

145 150 155 160

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Asp

165 170 175

Asp Asp Asp Asp Phe Asp Asp Glu Glu Ala Glu Glu Lys Ala Pro Val

180 185 190

Lys Lys Ser Ile Arg Asp Thr Pro Ala Lys Asn Ala Gln Lys Ser Asn

195 200 205
 Gln Asn Gly Lys Asp Ser Lys Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys Gly
 210 215 220
 Gln Glu Ser Phe Lys Lys Gln Glu Lys Thr Pro Lys Thr Pro Lys Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Ser Val Glu Asp Ile Lys Ala Lys Met Gln Ala Ser Ile Glu
 245 250 255
 Lys Gly Gly Ser Leu Pro Lys Val Glu Ala Lys Phe Ile Asn Tyr Val
 260 265 270
 Lys Asn Cys Phe Arg Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Cys
 275 280 285

Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys
 290 295

<210> 57

<211> 21

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> C-terminus of human nucleophosmin encoded by mutant NPM1c gene
 (amino acid sequence)

<400> 57

Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ala Val Glu Glu

1 5 10 15

Val Ser Leu Arg Lys

20

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 58

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 60

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 61

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NY-ESO-1 neoepitope (SLL)

<400> 62

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza virus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> influenza virus M1 protein neoepitope (GIL)

<400> 63

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Forward primer

<400> 64

gtcagtaatt gcggttctca cc 22

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Reverse primer

<400> 65

gtacagtggg aacaaagtcg 20

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Forward primer

<400> 66

ccggggtaga acctaaaagt tccg 24

<210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Reverse primer
 <400> 67
 tttgttctgc acgcgtggat c 21
 <210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Forward primer
 <400> 68
 gggttaattaa tcagcgaagc gatg 24
 <210> 69
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Forward primer
 <400> 69
 gttaggccag cttggcactt gatgt 25
 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Reverse primer
 <400> 70
 aggcacaatc agcattggta gctg 24
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope
 <400> 71

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Val Ala Val

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope

<400> 72

Cys Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope

<400> 73

Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope

<400> 74

Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope

<400> 75

Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys

1 5
 <210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: NPM1c neoepitope
 <400> 76
 Cys Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys

1 5 10
 <210> 77
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: AIQ X1 substitution
 <400> 77

Val Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ala Val

1 5
 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: AIQ X1 substitution
 <400> 78

Leu Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ala Val

1 5
 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: AIQ X1 substitution
 <400> 79

Ile Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X3 substitution

<400> 80

Ala Ile Asn Asp Leu Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X4 substitution

<400> 81

Ala Ile Gln Glu Leu Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X5 substitution

<400> 82

Ala Ile Gln Asp Ile Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X5 substitution

<400> 83

Ala Ile Gln Asp Val Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: AIQ X5 substitution
 <400> 84

Ala Ile Gln Asp Met Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 85

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X5 substitution

<400> 85

Ala Ile Gln Asp Ala Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X5 substitution

<400> 86

Ala Ile Gln Asp Phe Cys Leu Ala Val

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X6 substitution

<400> 87

Ala Ile Gln Asp Leu Ser Leu Ala Val

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X6 substitution

<400> 88

Ala Ile Gln Asp Leu Ala Leu Ala Val

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X7 substitution

<400> 89

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Ile Ala Val

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X7 substitution

<400> 90

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Val Ala Val

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X7 substitution

<400> 91

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Met Ala Val

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X7 substitution

<400> 92

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Ala Ala Val

1 5

<210> 93

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X7 substitution

<400> 93

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Phe Ala Val

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X8 substitution

<400> 94

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Leu Val Val

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X8 substitution

<400> 95

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Leu Leu Val

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AIQ X8 substitution

<400> 96

Ala Ile Gln Asp Leu Cys Leu Ile Val

1 5