(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161214
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/4611 (2023.05)
A61K 39/4632 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7036158(분할)
(22) 출원일자(국제) 2020년05월07일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-7040167
원출원일자(국제) 2020년05월07일
심사청구일자 2023년05월04일
(85) 번역문제출일자 2024년10월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/031898
(87) 국제공개번호 WO 2020/227546
국제공개일자 2020년11월12일
(30) 우선권주장
62/845,251 2019년05월08일 미국(US)

(71) 출원인
바이오엔테크 유에스 인크.
미국, 매사추세츠 02139, 캠브리지, 에리스트리트 40, 스위트 110
스티흐팅 허트 네덜란드 칸커 인스티튜트-안토니 판 레이우엔훅 지켄후이스
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 121
(72) 발명자
반 뷰렌 메릿 엠
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 에리 스트리트 40 스위트 110
렌칼라 디비야 레디
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 에리 스트리트 40 스위트 110
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

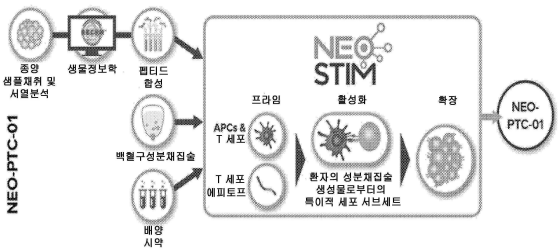
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **T 세포 제조 조성물 및 방법**

(57) 요 약

제어된 생체외 유도 또는 확장에 의한 항원 특이적 T 세포의 생성은 고도로 특이적이고 유리한 T 세포 요법을 제공할 수 있다. 본 개시는 암 및 다른 병태, 질환 및 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용할 수 있는 T 세포 제조 방법 및 치료적 T 세포 조성물 및 개인 항원 특이적 T 세포 요법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/464401 (2023.05)
A61K 39/46449 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0087 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 5/0638 (2023.05)
A61K 2239/55 (2023.05)
A61K 2239/57 (2023.05)
A61K 2239/59 (2023.05)

(72) 발명자
콜러 제시카
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 에리 스트리트 40 스위트 110
브라운 플라비안 듀발
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 에리 스트리트 40 스위트 110
쿡신 크리스티나 머피
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 에리 스트리트 40 스위트 110
반 덴 베르크 요스트 휘베르트
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 121
드 보에르 레나테
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 121
바커 누어
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 121
슈마허 톤
네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레즈만라안 121

명 세 서

청구범위

청구항 1

환자의 생물학적 샘플로부터 생체외 확장된 세포 개체군을 포함하는 조성물로서,

조성물은 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 $1x10^{8}$ 내지 $1x10^{11}$개의 세포를 포함하고, 생체외 확장된 세포 개체군에서 이펙터 기억 T 세포 (CD62L- 및 CD45RA-)인 CD8+ T 세포의 백분율은 적어도 60%이고;

생체외 확장된 세포 개체군에서 CD8+ T 세포의 총 수 중 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율은, 환자의 생물학적 샘플에서 CD8+ T 세포의 총 수 중 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율에 비해 적어도 2배 더 높고;

생체외 확장된 세포 개체군에서 CD4+ T 세포의 총 수 중 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율은, 환자의 생물학적 샘플에서 CD4+ T 세포의 총 수 중 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율에 비해서 적어도 2배 더 높은 것인

조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

생물학적 샘플이 말초 혈액 샘플, 백혈구성분채집술 샘플 또는 성분채집술 샘플이고, 환자는 암을 갖고 있는 인간 대상체인 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 대상체는 (i)절제불가 흑색종을 갖거나, (ii) 이전에 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제 및 CTLA-4 억제제 함유 요법을 받았었고 질환 진행을 가지거나, (iii) PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제를 적어도 3개월 동안 받았었거나 현재 받고 있고 안정한 질환 또는 무증상성 진행성 질환을 갖는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군은,

(a) 항원 제시 세포(APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포 개체군에서 CD14+ 세포 및 CD25+ 세포를 고갈시키는 단계로서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 CD14 및 CD25 고갈된 면역 세포 개체군을 형성하고, 면역 세포 개체군은 인간 대상체의 생물학적 샘플에서 유래하는 단계;

(b) APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 CD14 및 CD25 고갈된 면역 세포 개체군을 (i) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드(FLT3L) 및 (ii) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 두 개의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 존재 하에서, 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 자극된 T 세포를 포함하는 제2 세포 개체군을 형성시키는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 얻은 제2 세포 개체군에서 자극된 T 세포를 확장하여, 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생체외 확장된 세포 개체군을 형성하는 단계로서, 종양 항원 특이적 T 세포는

(i) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 두 개의 상이한 종양 항원 에피토프 서열 중 적어도 한 개의 종양 항원 에피토프 서열, 및 (ii) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계;

를 포함하는 방법에 의해 수득되는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 CD8+ T 세포의 적어도 0.1%가 미경험 CD8+ T 세포에서 유래한 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포인 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 CD4+ T 세포의 적어도 0.1%가 미경험 CD4+ T 세포에서 유래한 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포인 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 10%인 것인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 TNFα+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 5%인 것인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 IFNɣ+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 15%인 것인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 TNFα+ 및 IFNɣ+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 2%인 것인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 TNFα+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 0.5%인 것인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 IFNɣ+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 5%인 것인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 생체외 확장된 세포 개체군 내 TNFα+ 및 IFNɣ+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 0.1%인 것인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 미경험 T 세포(CD62L+ 및 CD45RA+)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 15% 이하인 것인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 이펙터 T 세포(CD62L- 및 CD45RA+)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 5% 이하인 것인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 중심 기억 T 세포(CD62L+ 및 CD45RA-)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 적어도 10%인 것인 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 미경험 T 세포(CD62L+ 및 CD45RA+)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD8+ T 세포의 백분율은 25% 이하인 것인 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 이펙터 T 세포(CD62L- 및 CD45RA+)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD8+ T 세포의 백분율은 10% 이하인 것인 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 중심 기억 T 세포(CD62L+ 및 CD45RA-)인 생체외 확장된 세포 개체군 중 CD8+ T 세포의 백분율은 적어도 15%인 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 조성물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **교차 참조**

[0002] 본 출원은 2019년 5월 8일 출원된, 미국 가출원 제62/845,251호의 이득을 청구하고, 이의 전문을 참조로 본 명세서에 편입시킨다.

배 경 기 술

[0003] 종양 백신은 전형적으로 종양 세포를 인식하여 용해시키는 항원-특이적 세포독성 T 세포 (CTL)를 유도시키기 위해 함께 작용하는 종양 항원 및 면역자극성 분자 (예를 들어, 보강제, 사이토카인 또는 TLR 리간드)로 구성된다. 이러한 백신은 공유된 조직 제한적 종양 항원 또는 전체 종양 세포 조제물의 형태로 공유 및 환자-특이적 항원의 혼합물을 함유한다. 공유된 조직 제한적 종양 항원은 이상적으로 많은 개체 전반에서 종양내에 선택적 발현되는 면역원성 단백질이고 일반적으로 합성 펩티드 또는 재조합 단백질로서 환자에게 전달된다. 대조적으로, 전체 종양 세포 조제물은 자기유래 조사된 세포, 세포 용해물, 세포 융합체, 열-충격 단백질 조제물 또는 전체 mRNA로서 환자에게 전달된다. 전체 종양 세포가 자기유래 환자로부터 단리되므로, 세포는 환자-특이적 종양 항원을 비롯하여 공유된 종양 항원을 포함할 수 있다. 마지막으로, 변경된 아미노산 서열을 야기시키는 종양-특이적 돌연변이 (환자-특이적일 수 있거나 또는 공유될 수 있음)를 갖는 단백질로 이루어진, 백신에서 거의 사용하지 않았던, 제3 클래스의 종양 항원, 네오항원이 존재한다. 이러한 돌연변이된 단백질은 (a) 돌연변이 및 이의 상응하는 단백질이 오직 종양에만 존재하므로 종양 세포에 고유하고; (b) 중심 내성을 피하므로 아마도 보다 더 면역원성일 것이고; (c) 체액성 및 세포성 면역력 둘 모두에 의해 포함되는 면역 인식을 위한 우수한 표적을 제공한다.

[0004] 양자 면역요법 또는 양자 세포 요법 (ACT)은 질환의 요법을 위한 대상체로의 림프구의 전달이다. 양자 면역요법은 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성질환, 및 면역결핍을 포함한 광범위하게 다양한 질환을 치료하기 위한 이의 잠재성을 인식해야만 한다. 그러나, 전부는 아니지만, 대부분의 양자 면역요법 전략은 임상적으로 유효한, 치료적 용량의 T 세포를 생성시키기 위해 T 세포 활성화 및 확장 단계를 요구한다. 생 세포 배양의 고유한 복잡성 및 환자마다의 가변성으로 인해, 조작된 T 세포를 포함하는, 치료적 용량의 T 세포를 생성시키기 위한 현재 기술들은 염색체 T 세포 제조 과정으로 인해 여전히 제한적이다. 현행 T 세포 제조 방법은 쉽게 규모확장 가능하지 않거나, 반복가능하지 않거나, 또는 효율적이지 않고 종종 이펙터 면역 세포 기능의 손실 및 소진 경향이 있을 수 있는 열등한 T 세포 생성물을 생성한다. 오늘날, 조작된 T 세포 양자 면역요법은 오직 제한된 성공만으로 충족되었고 일상적으로 가변적인 임상 활성을 보인다. 그러므로, 이러한 요법은 광범위한 임상 용도에 적합하지 않다. 따라서, 바람직한 표현형 및 기능을 갖는 항원 특이적 T 세포의 확장 및 유도를 위한 조성물 및 방법을 개발하려는 요구가 남아있다.

발명의 내용

[0005] **요약**

[0006] 본 개시는 임상적 개발 및 용도를 위한 신규 및 개선된 T 세포 치료제를 제공한다. 자기유래 T 세포 치료제가 사용에 안정하지만, 몇몇 대폭적인 개선이 치료 표준을 충족하는데 필수적이고 이 분야의 개발은 빠르나 곤란에

시달리고 있다. 출원인이 이전에 개시한 출원은 암에서 T 세포 요법을 위한 조성물 및 방법의 특징적인 개발을 제공한다 (WO2019/094642). 본 출원은 생체외 면역 세포 조제물의 상이한 단계에서 특이적 마커를 발현하는 소정 세포의 고갈이 고도로 면역원성인 세포 조성물을 제공한다는 놀라운 발견으로부터 기인한다. 본 개시는 또한 부분적으로 항원 자극을 위한 새롭고 개선된 방법의 개발과 그리하여 치료제 개발을 위한 개선된 세포 조성물의 생성으로부터 유래된다. 본 명세서는 새로운 방법 및 조성물을 제공하고, 여기서, 적어도 부분적으로, 생체외 자극 및 세포 확장 환경으로부터 소정 면역 세포의 선택적 고갈이 새로운 치료 조성물 및 개선된 방법을 제공한다.

[0007] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하기 위한 개선된 생체외 방법을 제공하고, 방법은 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 형성시키는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 유래된 것인, 단계; 및 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (A) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (B) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재 하에서 인큐베이션시켜서; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성시키는 단계; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열 및 (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계; 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 인간 대상체에게 투여하는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군은 $1x10^{8}$ 내지 $1x10^{11}$개의 총 세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0008] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하기 위한 개선된 생체외 방법을 제공하고, 방법은 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 형성시키는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 유래된 것인 단계; 및 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (A) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (B) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재 하에서 인큐베이션시켜서, 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성시키는 단계; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열 및 (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현된 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계; 및 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 인간 대상체에게 투여하는 단계로서, 인간 대상체는 절제불가 흑색종을 갖거나, 이전에 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제 및 CTLA-4 억제제 함유 요법을 받았었고 질환 진행을 가지거나, 또는 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제를 적어도 3개월 동안 받았었거나 또는 현재 받고 있고 안정한 질환 무증상성 진행성 질환을 갖는 것인 단계를 포함한다.

[0009] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하기 위한 개선된 생체외 제조 방법을 제공하고, 방법은 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 형성시키는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 유래된 것인 단계; 및 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 존재 하에서 인큐베이션시켜서; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성하는 단계; 및 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열 및 (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0010] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하기 위한 개선된 생체외 제조 방법을 제공하고, 방법은 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 (i) 인간 대상체로부터의 세척 및/또는 저온저장된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플로부터 직접적으로, (ii) 인간 대상체의 말초 혈액 중 미성숙 DC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 미성숙 수지

상 세포 (DC)를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (iii) 인간 대상체의 말초 혈액 중 성숙 DC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 성숙 DC를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (iv) 인간 대상체의 말초 혈액 중 미성숙 DC 대 성숙 DC의 비율과 대략 동일한 미성숙 DC 대 성숙 DC의 비율을 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (v) 미성숙 DC를 성숙 DC로 성숙화시키는 단계를 겪지 않은 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (vi) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 APC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 APC를 함유하는 인간대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (vii) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 DC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 DC를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (viii) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 CD303+의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 CD303+ 세포를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (ix) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 CD141+의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 CD141+ 세포를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, (x) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 마크로파지의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 마크로파지를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, 또는 (xi) 인간 대상체의 말초 혈액 중 총 세포 개체군 중 CD19+의 백분율과 대략 동일한 백분율의 총 세포 개체군 중 CD19+를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터, 고갈시켜서; APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 PBMC의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 형성시키는 단계; 및 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 (b) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (A) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (B) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재 하에서 인큐베이션시켜서; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성시키는 단계; 및 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 T 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열 및 (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 방법은 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 (i) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (ii) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 존재 하에서 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 도입 단계는 전기천공 또는 뉴클레오펙션 (nucleofection) 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전기천공 또는 뉴클레오펙션 단계는 단계 (a)로부터의 APC 및 T 세포의 제1 개체군의 APC로부터 T 세포를 분리시키는 단계없이 수행된다.

[0014] 일부 실시형태에서, 방법은 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 (i) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (ii) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 코딩하는 mRNA의 존재 하에서 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서, mRNA는 5' 캡 (CAP)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 캡은 CAP-1이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 3' 폴리A 테일을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 길이가 120 내지 135개의 뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열의 제1 종양 항원 에피토프 서열은 링커 서열을 통해서 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열의 제2 종양 항원 에피토프 서열에 연결된다. 일부 실시형태에서, 5' 캡은 링커 서열을 통해서 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 코딩하는 서열에 작동적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열은 단일 폴리펩티드 사슬로서 발현된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 LPS 및 IFNγ의 존재 하에서 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열은 각각이 8 내지 12 아미노산 길이이다. 일부 실시형태에서, 적어도 2종의 상이한 종양 항원 에피토프 서열은 각각이 15 내지 25 아미노산 길이이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상의 상이한 종양 항원 에피토프 서열을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군은 $1x10^{8}$ 내지 $1x10^{11}$의 총 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군은 $1x10^{8}$ 내지 $1x10^{11}$개의 CD3+ 세포를 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 절제불가 흑색종을 갖는다. 절제가능 흑색종과 달리, 종양 침윤성 림프구(TIL)는 절제불가 흑색종으로부터 수득될 수 없고, 따라서, TIL은 절제불가 흑색종의 치료에 사용될 수 없다. 본 명세서에 제공되는 방법 및 조성물의 한 장점은 그들이 절제불가 흑색종을 치료하는데 사용될 수 있다는 것이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제 및 CTLA-4 억제제 함유 요법을 이전에 받았었고 질환 진행을 갖는다.

[0020] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제를 적어도 3개월 동안 받았었거나 또는 현재 받고 있고 안정한 질환 무증상성 진행성 질환을 갖는다.

[0021] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD3+ 세포의 백분율은 총 세포 개체군의 적어도 40% 또는 50% 또는 60%이다.

[0022] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD107a+ 세포의 개체군은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 10%이다.

[0023] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 TNFα+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 5%이다.

[0024] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 IFNɣ+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 15%이다.

[0025] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 TNFα+ 및 IFNɣ+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 2%이다.

[0026] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 TNFα+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 0.5%이다.

[0027] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 IFNɣ+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 5%이다.

[0028] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 TNFα+ 및 IFNɣ+ 및 CD107a+ 세포의 백분율은 종양 항원-특이적 T 세포 개체군의 적어도 0.1%이다.

[0029] 일부 실시형태에서, 미경험 T 세포 (CD62L+ 및 CD45RA+)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 15% 이하이다.

[0030] 일부 실시형태에서, 이펙터 기억 T 세포 (CD62L- 및 CD45RA-)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 적어도 60%이다.

[0031] 일부 실시형태에서, 이펙터 T 세포 (CD62L- 및 CD45RA+)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 5% 이하이다.

[0032] 일부 실시형태에서, 중심 기억 T 세포 (CD62L+ 및 CD45RA-)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 백분율은 적어도 10%이다.

[0033] 일부 실시형태에서, 미경험 T 세포 (CD62L+ CD45RA+)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD8+ T 세포의 백분율은 25% 이하이다.

[0034] 일부 실시형태에서, 이펙터 기억 T 세포 (CD62L- CD45RA-)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD8+ T 세포는 적어도 60%이다.

[0035] 일부 실시형태에서, 이펙터 T 세포 (CD62L- CD45RA+)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD8+ T 세포는 10% 이하이다.

[0036] 일부 실시형태에서, 중심 기억 T 세포 (CD62L+ CD45RA-)인 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된

개체군 중 CD8+ T 세포는 적어도 15%이다.

[0037] 일부 실시형태에서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군은 표적 세포의 인식 시에 사이토카인을 생산하고 탈과립화를 초래한다.

[0038] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 항-체크포인트 억제제 요법에 불응성이다.

[0039] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 18세 내지 75세이다.

[0040] 일부 실시형태에서, 인간 대상체는 BRAF 유전자에 돌연변이를 가지고 B-raf 억제제 또는 B-raf/MEK 병용 요법을 이전에 받았었다.

[0041] 일부 실시형태에서, 고갈 단계는 성숙 수지상 세포 (DC)로 단핵구 성숙화 단계를 겪지 않은 인간 대상체로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플로부터 CD14+ 세포 및 CD25+ 세포를 고갈시키는 단계를 포함한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 고갈 단계는 성숙 수지상 세포 (DC)로 단핵구 성숙화 단계를 겪지 않은 인간 대상체로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플로부터 CD11b+ 세포를 고갈시키는 단계를 더 포함한다.

[0043] 일부 실시형태에서, 단계 (b) 및 (c)는 28일 미만 내에 수행된다.

[0044] 일부 실시형태에서, 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD8+ T 세포의 총 수 중 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율은 생물학적 샘플 중 CD8+ T 세포의 총 수 중 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율에 비해 적어도 2배 더 높다.

[0045] 일부 실시형태에서, 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 총 수 중 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율은 생물학적 샘플 중 CD4+ T 세포의 총 수 중 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포의 분율에 비해서 적어도 2배 더 높다.

[0046] 일부 실시형태에서, 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD8+ T 세포의 적어도 0.1%는 미경험 CD8+ T 세포로부터 유래된 CD8+ 종양 항원-특이적 T 세포이다.

[0047] 일부 실시형태에서, 종양 항원 특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군 중 CD4+ T 세포의 적어도 0.1%는 미경험 CD4+ T 세포로부터 유래된 CD4+ 종양 항원-특이적 T 세포이다.

[0048] 일부 실시형태에서, 확장 단계는 (A) 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 성숙 APC의 제2 개체군과 접촉시키는 단계로서, 성숙 APC의 제2 개체군은 (i) FLT3L과 인큐베이션되었고, (ii) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 제시하는 것인 단계; 및 (B) 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 제2 시간 기간 동안 확장시켜서, T 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계를 포함한다.

[0049] 일부 실시형태에서, 성숙 APC의 제2 개체군은 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 성숙 APC의 제2 개체군과 접촉시키는 단계 이전 적어도 1일 동안 FLT3L과 인큐베이션되었다.

[0050] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 샘플, 백혈구성분채집술 샘플 또는 성분채집술 샘플이다.

[0051] 일부 실시형태에서, 방법은 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 수확하는 단계, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 저온저장하는 단계, 또는 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 함유하는 약학 조성물을 제조하는 단계를 더 포함한다.

[0052] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14/CD25 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 FLT3L 및 폴리펩티드를 코딩하는 RNA의 존재 하에서 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0053] 일부 실시형태에서, 암을 갖는 인간 대상체는 생물학적 샘플이 수득된 인간 대상체이다.

[0054] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 길이가 8 내지 50개의 아미노산이다.

[0055] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 2종의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하고, 각각은 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현된다.

[0056] 일부 실시형태에서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시키는 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 개체군을 CD14 결합제 및/또는 CD25 결합제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0057] 일부 실시형태에서, 고갈 단계는 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD19+ 세포를 고갈시키는 단계를 더 포함한다.

[0058] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하기 위한 생체외 제조 방법을 제공하고, 방법은 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD11b+ 세포를 고갈시켜서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD11b 고갈된 개체군을 형성시키는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 유래된 것인 단계; 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD11b 고갈된 개체군을 제1 시간 기간 동안 (A) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (B) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재 하에서 인큐베이션시켜서; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성시키는 단계; 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열 및 (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포 또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0059] 본 명세서는 본 명세서에 기술된 방법으로 생성된 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군; 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0060] 본 명세서는 (a) 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군으로서, 면역 세포의 개체군은 폴리펩티드의 에피토프에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함하고, (i) 면역 세포의 개체군 중 CD11b를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD11b를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적고/적거나, (ii) 면역 세포의 개체군 중 CD11c를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD11c를 발현하는 면역 세포의 양을 비례적으로 초과하는 것인, 개체군; 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0061] 본 명세서는 (a) 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군으로서, 면역 세포의 개체군은 폴리펩티드의 에피토프에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함하고, APC-자극된 T 세포는 사이토카인과 인큐베이션된 것인 개체군; (b) 사이토카인; 및 (c) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0062] 본 명세서는 (a) fms-유사 티로신 키나제 3 리간드 (FLT3L)가 투여된 대상체로부터의 생물학적 샘플 유래의 면역 세포 개체군으로서, 면역 세포의 개체군은 폴리펩티드의 에피토프에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함하는 것인 개체군; 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0063] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 대상체로부터의 생물학적 샘플 유래이다.

[0064] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 fms-유사 티로신 키나제 3 리간드 (FLT3L)가 투여된 대상체로부터의 생물학적 샘플 유래이다.

[0065] 일부 실시형태에서, APC-자극된 T 세포는 사이토카인과 인큐베이션되었고 약학 조성물은 사이토카인을 더 포함한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군 중 CD11b를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD11b를 발현하는 면역 세포의 양에 비해서 비례적으로 적다.

[0067] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군 중 CD11c를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD11c를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 많다.

[0068] 일부 실시형태에서, 개체군 중 CD14를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적다.

[0069] 일부 실시형태에서, 개체군 중 CD25를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD25를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적다.

[0070] 일부 실시형태에서, 개체군 중 CD19를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD19를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적다.

[0071] 일부 실시형태에서, APC는 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC이다.

[0072] 일부 실시형태에서, APC-자극된 T 세포는 FLT3L-자극된 APC로 자극된 T 세포이다.

[0073] 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-7 또는 IL-15 또는 IL-21이다.

[0074] 일부 실시형태에서, APC-자극된 T 세포는 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자 상의 에피토프를 제시하는 항원 로딩된 APC에 의해 자극된 T 세포를 포함한다.

[0075] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 형질세포양 수지상 세포 (pDC), CD11c+ DC, CD1c+ DC, 또는 CD141+ DC를 포함한다.

[0076] 일부 실시형태에서, CD11b 세포는 CD16+ 단핵 세포를 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 생체외에서 세포 성장 및 유지를 촉진하는 작용제를 더 포함하고, 성장 인자, 사이토카인, 아미노산, 보충제 또는 이의 조합을 포함한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군 중 CD1c를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD1c를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 많다.

[0079] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군 중 CD141을 발현하는 면역 세포 또는 APC의 양은 생물학적 샘플 중 CD141을 발현하는 면역 세포 또는 APC의 양에 비해 비례적으로 많다.

[0080] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 포함하는 세포 개체군은 20% 초과, 25% 초과, 30% 초과, 35% 초과, 40% 초과, 45% 초과, 50% 초과, 60% 초과 또는 70% 초과의 CD11c+ 세포를 포함한다.

[0081] 일부 실시형태에서, APC-자극된 T 세포는 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 또는 5% 미만의 CD11b+ 세포를 함유하는 세포 개체군에 의해 자극된 T 세포를 포함한다.

[0082] 일부 실시형태에서, APC-자극된 T 세포는 90% 초과의 CD11c+ 세포를 함유하는 세포 개체군에 의해 자극된 T 세포를 포함한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 CD11c+, CD1c+, 또는 CD141+ 세포인 네오항원성 펩티드 발현 세포를 70% 초과로 함유하는 세포 개체군에 의해 자극된 T 세포를 포함한다.

[0084] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 에피토프에 특이적인 약학 조성물 중 T 세포를 적어도 60%로 포함한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 CD11b+ 및/또는 CD19+ 세포의 감소 또는 고갈 없이 항원 로딩된 APC와 단리된 T 세포를 접촉시켜서 수득된 세포 조성물과 비교하여, 네오항원 프라임된 T 세포로 전환되거나 또는 유도된 미경험 T 세포를 더 큰 비율로 포함한다.

[0086] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 에피토프에 특이적인 항원-특이적 활성화된 T 세포 전환되거나 또는 유도된 미경험 T 세포를 35% 초과로 포함한다.

[0087] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 CD11b+ 세포 및/또는 CD19+ 세포의 감소 또는 고갈없이 항원 로딩된 APC와 단리된 T 세포를 접촉시켜서 수득된 세포 조성물과 비교하여 암 네오항원 특이적 CD8+ T 세포를 더 큰 비율로 포함한다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 적어도 30% CD8 + T 세포를 포함한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 CD11b+ 세포 및/또는 CD19+의 감소 또는 고갈없이 항원 로딩된 APC와 단리된 T 세포를 접촉시켜 수득된 세포 조성물과 비교하여 더 큰 비율의 기억 T 세포를 포함한다.

[0090] 본 명세서는 본 명세서에 기술된 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0091] 본 명세서는 폴리펩티드의 에피토프에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 (a) 항원 제시 세포 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD11b를 발현하는 세포를 고갈시켜서, T 세포를 포함하는 면역 세포의 CD11b-고갈된 개체군을 형성시키는 단계; 및 (b) T 세포를 포함하는 면역 세포의 CD11b-고갈된 개체군을 인큐베이션 또는 확장시키는 단계로서, 에피토프에 특이적인 TCR을 포함하는 기억 T 세포를 확장시키거나, 또는 에피토프에 특이적인 TCR을 포함하는 미경험 T 세포을 유도시키는 것인 단계를 포함한다.

[0092] 본 명세서는 에피토프에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 (a) CD11c를 발현하는 세포에 대해 APC 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군을 농축시켜서, T 세포를 포함하는 면역 세포의 CD11c-농축된 개체군을 형성시키는 단계; 및 (b) T 세포를 포함하는 면역 세포의 CD11c-농축된 개체군을 인큐베이션시키거나 또는 확장시키는 단계로서, 에피토프에 특이적인 TCR을 포함하는 기억 T 세포가 확장되거나, 또는 에피토프에 특이적인 TCR을 포함하는 미경험 T 세포를 유도시키는 것인 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, APC 조제물을 위한 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC를 포함한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물을 제조하는 단계를 더 포함한다.

[0094] 일부 실시형태에서, APC 조제물을 제조하기 위한 방법은 APC를 FLT3L과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0095] 일부 실시형태에서, APC 조제물을 제조하기 위한 방법은 APC를 폴리펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0096] 본 명세서는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 면역 세포의 개체군은 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함하고, 대상체는 fms-유사 티로신 키나제 3 리간드 (FLT3L)가 투여되었었다.

[0097] 본 명세서는 (a) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (b) 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 면역 세포의 개체군은 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함한다.

[0098] 본 명세서는 (a) 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 대상체에게 투여하는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 제시 세포 (APC)-자극된 T 세포를 포함하는 것인 단계; 및 (b) 항원 펩티드 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 항원 펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0099] 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포의 개체군의 투여 이전에 대상체에게 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 투여하는 단계를 더 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0100] **도 1A**는 항원 특이적 T 세포 제조 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 1B는 항원 특이적 T 세포 제조 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 1C는 항원 특이적 T 세포 제조 프로토콜의 예시적인 대체 개략도를 도시한다.

도 2는 장형 펩티드 또는 단형 펩티드에 의해 유도된 항원 특이적 $CD8^+$ 기억 T 세포의 분율을 보여주는 예시적인 결과를 도시한다. "원액(bulk)"은 유도에 사용된 T 세포 함유 샘플이 전체 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 것을 의미한다. "$Treg^-$"는 유도에 사용된 T 세포 함유 샘플이 CD25 발현 세포가 고갈된 PBMC인 것을 의미한다.

도 3은 GAS7 펩티드로 유도된 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포의 분율을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 4는 HIV 단형 펩티드, 단형의 사전 확인된 네오항원 (previously identified neoantigen) (PIN), 또는 장형 PIN의 펩티드 풀에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포 반응을 보여주는 예시적인 결과를 도시한다. "전체 PBMC"는 유도에 사용된 T 세포 함유 샘플이 전체 PBMC인 것을 의미한다. "$CD25^-$ PBMC"는 유도에 사용된 T 세포 함유 샘플이 $CD25^+$ 세포가 고갈된 것을 의미한다. 단형, 단형 펩티드, 또는 쇼트머 (shortmer); 장형, 장형 펩티드, 또는 롱머 (longmer).

도 5A는 표시된 조건 하에서 단일한 사전 확인된 네오항원 (PIN)에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응

의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 5B는 표시된 조건 하에서 단일한 사전 확인된 네오항원 (PIN)에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 6은 2명의 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 표시된 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포 반응을 도시하는 예시적인 결과를 도시한다.

도 7은 자극 이전 및 최대 3회 라운드의 자극 이후에 건강한 공여자에서 표시된 돌연변이된 에피토프에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포 반응의 예시적인 유세포측정 그래프를 도시한다.

도 8A는 바이러스 항원에 대한 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포 반응s의 결과를 보여주는 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 최대 3회 라운드의 자극 이후에, 모든 $CD8^+$ T 세포의 대략 50%는 표시된 바이러스 에피토프 (CMV pp65, EBV YVL, EBV BMLF1 및 Mart-1)에 특이적이었다.

도 8B는 로딩된 바이러스 항원 존재 및 부재의 APC와 인큐베이션되고나서, 펩티드 로딩된 항원 제시 세포에 대한 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포 반응의 리콜 어세이의 예시적인 결과를 도시한다. 표시된 사이토카인을 방출하는 2개 시점으로부터의 $CD8^+$ T 세포가 도표에 도시된다.

도 9는 유도된 T 세포 배양물이 항원 발현 종양주를 사멸시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해 사용된 세포독성 어세이의 예시적인 결과를 도시한다. 총 종양 세포에 대한 생 및 사멸 캐스파제 3 양성 종양 세포의 분율을 도시한다. 캐스파제 3 양성의 생존 종양 세포는 이른 세포 사멸을 겪은 세포를 표시한다.

도 10은 로딩된 PIN 존재 및 부재의 APC와 인큐베이션시키고 나서 펩티드 로딩된 항원 제시 세포에 대한 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포 반응의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. $CD4^+$ T 세포 방출 IFNγ의 백분율이 도시된다.

도 11은 돌연변이체 펩티드 또는 야생형 펩티드로 재자극시킨 이후에 IFNγ를 방출하는 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 백분율의 예시적인 결과를 도시한다.

도 12는 단형 HIV5 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 단기간 및 장기간 유도 둘 모두가 도시된다.

도 13은 인간 공여자로부터의 전체 PBMC 샘플을 사용한 단형 ME1 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응의 분율을 도시한 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 14는 인간 공여자로부터의 전체 PBMC 샘플을 사용한 단형 HIV3 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 15는 인간 공여자로부터의 전체 PBMC 샘플을 사용한 장형 CSNK1A1 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 16은 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 장형 CSNK1A1 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 17은 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 GAS7 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 18은 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 ACTN4 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 19A는 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 ACTN4 펩티드에 대한 항원 특이적

$CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 도시한 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 단기간 유도가 도시된다.

도 19B는 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 HIV3 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 장기간 유도가 도시된다.

도 20은 인간 공여자로부터의 전체 PBMC 샘플을 사용한 단형 HIV5 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 단기간 및 장기간 유도 둘 모두가 도시된다.

도 21은 인간 공여자로부터의 전체 PBMC 샘플을 사용한 단형 HIV3 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 도시하는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 단기간 유도가 도시된다.

도 22는 $CD25^+$ 세포가 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 PRDX5 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 초단기간 및 장기간 유도 둘 모두가 도시된다.

도 23은 $CD25^+$ 세포 흐름이 고갈된 인간 공여자로부터의 PBMC 샘플을 사용한 단형 HIV5 펩티드에 대한 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 단기간 및 장기간 유도 둘 모두가 도시된다.

도 24는 기억 T 세포의 확장 및 미경험 T 세포의 유도를 포함한 치료적 T 세포 조성물을 생성시키기 위한 방법의 예시적인 개략도가 도시된다.

도 25는 T 세포의 기능성, 표현형 및/또는 기능 및/또는 T 세포 반응을 시험하기 위한 예시적인 방법을 도시한다.

도 26은 T 세포의 기능성, 표현형 및/또는 기능 및/또는 T 세포 반응을 시험하기 위한 리콜 어세이의 예를 도시한다.

도 27A는 리콜 어세이에서, 별도로 또는 혼합물로서 수득된, 표지된 샘플에 의한 다중복합 샘플을 디컨볼루션(deconvolution)시키는 능력을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 고유하게 표지된 샘플은 최소 내지 전무한 교차-오염으로 다른 바코드로 분해되었다.

도 27B는 리콜 어세이에서 9종의 고유하게 표지된 샘플의 혼합물의 멀티머 염색에 의한 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포의 검출을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 28A는 비로딩된 DC 및 네오항원-로딩된 DC로 리콜된 6종의 고유하게 바코드화된 샘플을 사용한 리콜 어세이의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 28B는 리콜 반응 어세이에서 표시된 농도의 펩티드가 로딩된 DC와 인큐베이션된 기능수를 갖는 $CD4^+$ T 세포의 백분율의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 신생 $CD4^+$ T 세포 반응을 함유하는 2종의 유도된 배양물의 샘플은 바코드화되지 않고 단독으로 또는 미관련 샘플과 혼합하여 분석되었다. 바코드화는 검출가능한 기능성을 변경시키지 않았다. 세포로부터 유발된 반응의 규모 및 기능의 수는 샘플 바코드화에 따라 유의하게 변화되지 않았다.

도 29A는 바이러스 항원에 대한 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포 반응의 결과를 보여주는 예시적인 막대 그래프를 도시한다. CMV pp65, MART-1 및 EBV BRLF1 및 BMLF1 에피토프에 대한 $CD8^+$ 기억 반응은 출발한 건강한 공여자 물질에서 0.23%의 $CD8^+$ T 세포로부터 > 60% 까지 상승될 수 있었다.

도 29B는 바이러스 항원이 로딩 및 비로딩된 DC로 리콜되고 나서 바이러스 항원에 대한 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포 반응의 리콜 어세이의 예시적인 결과를 도시한다. 표시된 사이토카인을 방출하는 2개 시점으로부터의 $CD8^+$ T 세포의 분율이 도표에 도시된다.

도 30A는 동일 배양물에서 다수 특이성을 갖는 신생 유도된 $CD4^+$ 반응의 검출 및 기능적 특징규명에 의한 히트

확인의 예시적인 결과를 도시한다. 도시된 예에서, 유도는 HIV-음성 건강한 공여자에서 미경험 표적인, 10 HIV-유래 에피토프를 표적화하는 4종 복제 배양물에서 수행되었다. 항원-특이적 반응은 다양한 규모의 반응으로 4/4 생물학적 복제물에서 검출되었다.

도 30B는 동일한 배양물에서 다수의 특이성을 갖는 신생 유도된 $CD4^+$ 반응의 검출 및 기능적 특징규명에 의한 풀 디컨볼루션의 예시적인 결과를 도시한다. 다중 반응이 시험된 각 복제물에서 검출되었고, 동일한 2종 에피토프 (HIV #5 및 HIV #7)는 각 경우에서 최고 규모의 반응을 산출하였다.

도 30C는 동일 배양물에서 다수 특이성을 갖는 신생 유도된 $CD4^+$ 반응의 검출 및 기능적 특징규명에 의한 감도 결정의 예시적인 결과를 도시한다. 유사한 규모가 풀 디컨볼루션 어세이의 각 반응에 대해 관찰되었다. HIV #5, HIV #6 및 HIV #4에 대한 반응은 각각 0.45 μM, 0.43 μM 및 9.1 μM의 EC_{50} 을 입증하였다.

도 31은 항원 특이적 T 세포 제조 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 32는 T 세포 유도 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 33은 수지상 세포 생성 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 34는 환자-특이적 에피토프: $SRSF1_{E>K}$, $ARAP1_{Y>H}$ & $PKDREJ_{G>R}$ 를 표적화하는 흑색종 환자, 환자-특이적 에피토프 (AASDH neoORF 및 7개 모델 네오항원: $ACTN4_{K>N}$, $CSNK1A1_{S>L}$, DHX40neoORF, $GLI3_{P>L}$ $QARSR_{>W}$, $FAM178B_{P>L}$ 및 $RPS26_{P>L}$)를 표적화하는 흑색종 환자로부터의 백혈구성분채입술 물질에서 유도된 CD8+ T 세포 반응을 보여주는 예시적인 pMHC 멀티머 그래프를 도시한다. 첫번째 및 두번째 둘의 처음 패널 그래프는 기억 반응을 표시하고 나머지 그래프는 신생 반응을 표시한다.

도 35는 펩티드 자극 전 및 후에 $SRSF1_{E>K}$ 및 $ARAP1_{Y>H}$ 의 pMHC 멀티머 그래프의 예시적인 데이터를 도시하고 (좌측 패널), 파이 도표는 pMHC 멀티머$^+$ $CD8^+$ 또는 CD4+ T 세포 상에서 게이팅된, 네오항원 로딩된 DC로 재-챌린지시 네오항원 특이적 T 세포의 기능성을 도시한다. 흑색종을 갖는 환자에서 유도된 CD8+ 기억, CD8+ 신생 및 CD4+ 신생 반응의 다기능성 프로파일은 1, 2, 또는 3 기능의 조합 (예를 들어, 하나 이상의 기능은 IFNγ, TNFα, CD107a 및 4-1BB로부터 선택된 하나 이상의 인자의 생성임)으로 도시된다.

도 36은 돌연변이 및 야생형 펩티드에 대한 흑색종 환자에서 유도된 기억 및 신생 반응의 특이성을 도시한다. $SRSF1_{E>K}$ 및 $ARAP1_{Y>H}$ 특이적 T 세포 반응은 상이한 농도 (X 축: 0 μM, 0.05 μM, 0.2 μM, 0.8 μM, 및 3.2 μM)의 돌연변이체 또는 야생형 네오항원성 펩티드가 로딩된 DC로 챌린지되었고 샘플 중 총 CD8+ T 세포의 IFN-γ+ 및/또는 TNFα+ 및/또는 CD107a+ (Y 축)를 측정하였다. 양쪽 반응은 0 μM 농도에 대한 유의한 편차 및 야생형 네오항원성 펩티드에 대한 무반응성을 보여준다. 통계 분석: 조정된 p 값에 대한 FDR, P 값: * ≤ 0.05, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001.

도 37A는 $CD8^+CD107a^+$ T 세포의 빈도로 정량된 흑색종 환자에서 유도된 기억 반응의 세포독성 프로파일을 도시한다. 또한 aCAS3+ 종양 세포의 빈도로 정량된 이들 T 세포 반응에 의한 표적 세포 사멸을 도시한다. 유도된 CD8+ T 세포 반응의 세포독성 능력은 돌연변이체 또는 야생형 네오항원 형질도입된 종양 세포로 재-챌린지하여 평가되었다. 미-형질도입 종양 세포 (부모 A375 세포주) 또는 200 aa 구성체가 형질도입된 종양 세포가 사용되었다. 구성체는 돌연변이체 또는 야생형 서열, 중심 내 돌연변이를 함유하였다. CD8+ T 세포 상의 CD107a 및 종양 세포 상의 활성 캐스파제3의 상향조절은 공-배양 시에 측정하였다. 표적 비율: 3.3:1 ($SRSF1_{E>K}$).

도 37B는 $CD8^+CD107a^+$ T 세포의 빈도로 정량된 흑색종 환자에서 유도된 기억 반응의 세포독성 프로파일의 다른 예를 도시한다. 또한 aCAS3+ 종양 세포의 빈도로 정량된 이들 T 세포 반응에 의한 표적 세포 사멸을 도시한다. 유도된 CD8+ T 세포 반응의 세포독성 능력은 돌연변이체 또는 야생형 네오항원 형질도입된 종양 세포로 재-챌린지하여 평가하였다. 비-형질도입된 종양 세포 (부모 A375 세포주) 또는 200 aa 구성체가 형질도입된 종양 세포가 사용되었다. 구성체는 돌연변이체 또는 야생형 서열, 중심 내 돌연변이를 함유하였다. CD8+ T 세포 상의 CD107a 및 종양 세포 상의 활성 캐스파제3의 상향조절은 공-배양 시에 측정되었다. 붉은색 원형은 pMHC+ 분획을 강조한다. 이펙터: 표적 비율: 5:1 ($SRSF1_{E>K}$). 통계 분석: 비대응 T 검정, p 값s ** ≤ 0.01, **** ≤ 0.0001.

도 37C는 $CD8^+CD107a^+$ T 세포의 빈도로 정량된 흑색종 환자에서 유도된 신생 반응의 세포독성 프로파일을 도시한

다. 또한 aCAS3+ 종양 세포의 빈도로 정량된 이들 T 세포 반응에 의한 표적 세포 사멸을 도시한다. 유도된 CD8+ T 세포 반응의 세포독성 능력은 돌연변이체 또는 야생형 네오항원 형질도입된 종양 세포로 재-챌린지하여 평가하였다. 비-형질도입된 종양 세포 (부모 A375 세포주) 또는 200 aa 구성체가 형질도입된 종양 세포가 사용되었다. 구성체는 돌연변이체 또는 야생형 서열, 중심에 돌연변이를 함유하였다. CD8+ T 세포 상의 CD107a 및 종양 세포 상의 활성 캐스파제3의 상향조절은 공-배양 시에 측정되었다. 원형은 pMHC+ 분획을 강조한다. 이펙터: 표적 비율: 0.66:1 (ARAP1Y>H). 통계 분석: 비대응 T 검정, p 값s ** ≤ 0.01, **** ≤ 0.0001.

도 38A는 흑색종 환자에서 네오항원 특이적 CD4+ T 세포 반응의 확인을 도시한다. 반응은 돌연변이체 네오항원성 펩티드 로딩된 DC (0.8 μM)로 재-챌린지했을 때 IFN-γ 및 TNFα의 생성 (Y 축)을 기반으로 확인한다. $MKRN1_{S>L}$, $CREBBP_{S>L}$, 및 $TPCN1_{K>E}$ 는 양성 반응으로서 확인되었다.

도 38B는 표시된 돌연변이 및 야생형 펩티드에 대한 도 38A에 도시된 CD4+ T 세포 반응의 특이성을 도시한다. 보강 연구에서 도 38A에 도시된 CD4 T 세포 반응은 상이한 농도 (X 축 - 0 μM, 0.05 μM, 0.2 μM, 0.8 μM 및 3.2 μM)의 돌연변이체 및 야생형 네오항원성 펩티드로 챌린지되었고 샘플 중 총 CD4+의 IFNγ+ 및/또는 TNFα+ 를 측정하였다 (Y 축). 2개의 CD4+ T 세포 반응 ($MKRN1_{S>L}$ 및 $CREEBP_{S>L}$)은 0 μM 농도에 대해 유의한 편차를 보이고 야생형 네오항원성 펩티드에 반응성이지 않지만 $TPCN1_{K>E}$ 반응은 돌연변이체 및 야생형 네오항원성 펩티드 둘 모두에 반응성이었다. 통계 분석: p 값에 대한 FDR, p 값 <0.05);

도 38C는 1, 2, 3, 또는 4 기능의 조합 (예를 들어, 하나 이상의 기능은 IFNγ, TNFα, CD107a 및 4-1BB로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 생성임)으로 도시되는 바와 같이, 이들 CD4+ T 세포 반응의 다기능성 프로파일을 도시한다. 확인된 CD4+ T 세포 반응의 다기능성은 돌연변이체 네오항원성 펩티드 로딩된 DC (0.8 μm)로 재-챌린지하여 평가되었다. 파이 도표에서 백분율은 기능성 CD4+ T 세포 (1, 2 및/또는 3 기능)의 백분율을 나타낸다. 환자에서 유도된 자극-후 CD4+ T 세포 반응으로부터 생성된 대표적인 데이터가 도시된다.

도 39는 1, 2 또는 3 기능의 조합 (예를 들어, 하나 이상의 기능은 IFNγ, TNFα 및 CD107a로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 생성임)으로 도시되는 에파카도스타트의 첨가 존재 또는 부재 하에 2명의 건강한 공여자에서 유도된 기억 반응의 기능성을 도시한다.

도 40은 에파카도스타트의 첨가 존재 또는 부재 하에 6 복제물 유도에서 유도된 신생 $CD8^+$ T 세포 반응 백분율 ('히트율', 4명 건강한 공여자의 평균)을 도시한다.

도 41A는 PD-1 차단 항체의 첨가 존재 또는 부재 하에, 본 명세서에 제공된 T 세포 제조 프로토콜로 유도 이후 건강한 공여자로부터의 항원 특이적 세포의 절대수를 도시한다.

도 41B는 PD-1 차단 항체의 첨가 존재 또는 부재 하에, 본 명세서에 제공된 T 세포 제조 프로토콜로 유도 이후 건강한 공여자로부터의 항원 특이적 세포의 절대수를 도시한다.

도 42A는 IL-12의 첨가 존재 또는 부재 하에 신생 CD8+ T 세포 구획으로부터 $CD8^+$ T 세포의 백분율로서 멀티머 양성 빈도를 도시한다.

도 42B는 IL-12의 첨가 존재 또는 부재 하에 신생 CD8+ T 세포 구획으로부터 CD8+ T 세포의 백분율의 예시적인 도표를 도시한다.

도 43은 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 상이한 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 미경험 CD8 세포가 반응성인 높은 면역원성 및 낮은 면역원성 항원에 대한 히트율 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 또한 Mart-1 펩티드 또는 높은 면역원성 및 낮은 면역원성 항원을 사용한 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 상이한 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 항원 특이적 세포의 절대수의 예시적인 도표를 도시한다.

도 44A는 3명의 상이한 건강한 공여자로부터의 PBMC를 사용한 표시된 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 CD123 양성 세포의 예시적인 유세포측정 결과를 도시한다.

도 44B는 건강한 공여자로부터의 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 표시된 CD11c+ 세포 서브세트의 절대수의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다.

도 45는 건강한 공여자로부터의 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 CD8 T 세포의 총수 및 표시된 세포 비율의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다.

도 46은 3명의 상이한 건강한 공여자로부터의 PBMC를 사용한 표시된 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 CD11b 양성 세포의 예시적인 유세포측정 결과를 도시한다.

도 47은 3명의 상이한 건강한 공여자로부터의 PBMC를 사용한 표시된 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 CD19 양성 세포의 예시적인 유세포측정 결과를 도시한다.

도 48은 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 세포의 확장 배수의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다.

도 49A는 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 미경험 CD8 T 세포가 반응성인 특이적 항원의 수를 표시한 예시적인 데이터를 도시한다. 결과는 3명의 건강한 공여자로부터 평균내었다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다. 데이터의 예시적인 도표는 아래 그래프에 도시된다.

도 49B는 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 미경험 CD8 세포가 반응성인 높은 면역원성 (좌) 및 낮은 면역원성 (우) 항원에 대한 히트율 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 결과는 3명의 건강한 공여자로부터 평균내었다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다.

도 50은 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 T 세포가 반응성인 높은 면역원성 및 낮은 면역원성 항원에 의해 활성화된 세포 개체군 중 항원 특이적 세포의 수의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저 Flt3L, FLT3L 처치 단독; CD11b, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포의 고갈; CD11b-/CD19-, FLT3L 처치 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈이다.

도 51A는 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 생 세포의 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저, FLT3L 처치 단독; 기저 + CD11b-/CD19-, FLT3L 처치, 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈; + APC, 기저 + CD11b-/CD19-에 첨가된 추가 PBMC 분획으로서, 추가 분획은 CD3, CD19, CD11b, CD25, 및 CD14 발현 세포가 고갈되었다.

도 51B는 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 생 세포의 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저, FLT3L 처치 단독; 기저 + CD11b-/CD19-, FLT3L 처치, 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈; + APC, 기저 + CD11b-/CD19-에 첨가된 추가 PBMC 분획으로서, 추가 분획은 CD3, CD19, CD11b, CD25, 및 CD14 발현 세포가 고갈되었다.

도 51C는 건강한 공여자로부터 유래된 PBMC를 사용한 3 항원 제시 세포 농축 및 항원 로딩 프로토콜을 수행한 후 생 세포의 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 처치는 기저, FLT3L 처치 단독; 기저 + CD11b-/CD19-, FLT3L 처치, 및 CD11b 발현 세포 및 CD19 발현 세포의 고갈; + APC, 기저 + CD11b-/CD19-에 첨가된 추가 PBMC 분획으로서, 추가 분획은 CD3, CD19, CD11b, CD25, 및 CD14 발현 세포가 고갈되었다.

도 51D는 예시적인 항원 제시 세포 농축 프로토콜을 사용하여, 공여자 당, CD8 세포가 반응성인 특이적 항원의 수를 표시하는 예시적인 데이터를 도시한다.

도 51E는 3명의 건강한 공여자의 평균에 대해 CD8 세포가 반응성인 표시된 펩티드에 대한 히트율 백분율의 예시적인 도표를 도시한다.

도 52A는 상이한 시점에 배양 과정에 첨가된 세포의 개체군이 항원 로딩된 APC로 자극 전에 막-투과성 아민-반응성 염료 (예를 들어, 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 또는 TagIT Violet™)로 표시된 실험의 예시적인 유세포측정 분석 결과를 도시한다. 제2 자극이 적용될 때, 14일 동안 이미 배양된 세포의 개체군은 하나의 염료로 표지되었지만, 항원 로딩된 APC 및 T 세포의 새로운 조제물을 함유하는 세포의 다른 개체군은 다른 염료

로 표지되었고, 2개 개체군을 함께 혼합하여 재자극 또는 확장을 수행하였다. 전체 항원 특이적 T 세포 풀에 대한 이들 개체군 각각의 상대적 분포는 각 염료의 존재 및 희석율로 표시되었다. 모든 경우에서, 세포의 개체군은 14일 동안 배양되었고 (1차 자극), 하나의 염료로 표시되고 나서, 1일 앞서 (표준 프로토콜), 4일 앞서 (5일 유리한 출발), 또는 6일 앞서 (7일 유리한 출발) 항원-자극된 다른 염료로 표지된 세포의 다른 개체군에 첨가되었다.

도 52B는 각각이 T 세포와 접촉 전 2일 또는 5일 또는 7일에 항원 로딩 APC에 대한 유리한 출발을 포함한 2개 자극이 존재하는, 3종의 상이한 T 세포 확장 프로토콜의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 52C는 도 52B에 도시된 3종의 상이한 T 세포 확장 프로토콜을 사용한 시간 경과에 따른 항원 특이적 T 세포수의 예시적인 그래프를 도시한다. 1, 표준 프로토콜; 2, 5일 유리한 출발; 3, 7일 유리한 출발.

도 53은 표시된 네오항원성 펩티드 (pep) 또는 네오항원 RNA로 처치된 배양물의 확장 배수의 예시적인 그래프를 도시한다. CD3 림프구를 분리 또는 제거한 후에, CD14/CD25 고갈된 PBMC 세포는 항원 (펩티드 또는 항원을 코딩하는 mRNA)으로 자극되었다. CD3 림프구 세포는 재도입되었고 14일 동안 자극되었다.

도 54는 표시된 네오항원성 펩티드 (pep) 또는 네오항원 RNA이 뉴클레오펙션된 배양물 중 멀티머 양성 항원 특이적 세포수의 예시적인 그래프를 도시한다. 배양물은 T 세포의 존재 하에서 또는 T 세포의 부재 (-CD3) 하에서 뉴클레오펙션되었다. Irr, 조사.

도 55는 단기간 유도 프로토콜에서 바이러스 펩티드 또는 펩티드를 코딩하는 RNA를 사용하는 항원 특이적 CD8+ 기억 반응 및 네오항원 코딩 펩티드 또는 RNA를 사용한 미경험 반응을 보여주는 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 56A는 네오항원을 코딩하는 서열을 포함하는 RNA의 생성 및 PBMC의 로딩 및 T 세포의 활성화에 그들을 사용하는 예시적인 과정의 개략도를 도시한다.

도 56B는 네오항원을 코딩하는 서열을 포함하는 RNA의 생성 및 PBMC의 로딩 및 T 세포의 활성화에 그들을 사용하는 예시적인 과정의 개략도를 도시한다.

도 57A는 네오항원의 스트링을 코딩하는 예시적인 RNA 콘카타머형 구성체의 개략도를 도시한다.

도 57B는 도 57A에 도시된 구성체 내 5' - 3' 배향의 네오항원 스트링의 예시적인 배열의 개략도를 도시한다.

도 58A는 PBMC에서 발현을 위한 콘카타머형 네오항원 스트링을 코딩하는 mRNA 중 5'-캡 구조를 도입시키기 위한 예시적인 mRNA 서열의 개략도를 도시한다. mRNA 스트링 중 "A" 뉴클레오티드의 첨가는 CleanCap® 기술과 상용성을 위해 사용되었다.

도 58B는 PBMC 중 상이한 5'-캡 구조를 갖는 콘카타머형 네오항원 스트링을 코딩하는 mRNA를 발현 후 24시간에 생 세포의 백분율을 나타내는 예시적인 도표를 도시한다.

도 58C는 PBMC 중 상이한 5'-캡 구조를 갖는 콘카타머형 네오항원 스트링을 코딩하는 mRNA를 발현 후 24시간에 GFP 양성 세포의 총수의 예시적인 도표를 도시한다.

도 59A는 mRNA를 만들기 위해 변형된 뉴클레오티드를 사용하여 표시된 예시적인 결과를 도시한다. mRNA는 mRNA 내 우리딘 (U) 및 시티딘 (C) 잔기의 전부 (전체) 또는 일부 (부분)를 치환시켜 변형되었다. 예를 들어, 부분 C 세트는 메틸 시티딘으로 치환된 30% C 잔기를 함유한다. 결과는 시간 경과에 따라 형질감염된 PBMC 중 mRNA 코딩된 펩티드의 발현에 대한 효과를 보여준다.

도 59B는 mRNA가 로딩된 PBMC로 자극된 멀티머 특이적 T 세포 생성에 대한 치환된 우리딘 및/또는 시티딘을 포함하는 mRNA의 상업적 및 내부 조제물의 효과를 비교하는 예시적인 데이터를 도시한다.

도 59C는 도 59B에 기술된 바와 같이 생성된 자극된 T 세포의 확장을 비교하는 예시적인 데이터를 도시한다.

도 60A는 세포에서 발현에 사용되는 쇼트머 (9-10 아미노산, 위) 및 롱머 (25 아미노산, 아래)를 사용한 mRNA 구성체의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 60B는 총 CD8+ 세포의 백분율로서 멀티머 특이적 CD8+ 세포의 예시적인 그래프를 도시한다. 멀티머 어세이에 사용된 항원이 도시된다.

도 60C는 쇼트머 (9-10 아미노산) 롱머 (25 아미노산) 펩티드 자극된 APC 및 동일한 쇼트머 (9-10 아미노산) 및

롱머 (25 아미노산) 펩티드를 코딩하여 함유하는 APC를 비교한, 멀티머 양성 CD8+ T 세포의 검출의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다.

도 61A는 도 61B-61D에 도시된 실험의 세포가 형질감염된 예시적인 RNA 구성체의 개략도를 도시한다.

도 61B는 멀티머 어세이로부터의 결과의 예시적인 도표를 도시한다. PBMC 취급의 모든 3개 조건 하에서, RNA 형질감염된 PBMC는 항원 특이적 T 세포의 생성에서 펩티드 로딩된 PBMC에 비해 양호하였다. Gli3 항원 경우, 펩티드 로딩된 PBMC와 비교하여 멀티머 양성 세포에서 10배 초과 증가가 주목할만하다.

도 61C는 CD3 세포의 고갈 존재 및 부재하의 각 표시된 세트에서 Gli3 멀티머 양성 T 세포의 검출을 보여주는 예시적인 유세포측정 데이터를 도시한다. CD25+ PBMC의 형질감염은 직접적으로 CD14 및 CD25 세포가 고갈된 PBMC 또는 냉동 스톡으로부터 해동시킨 PBMC에 비해서 증가된 멀티머 양성 세포를 산출한다.

도 61D는 멀티머 어세이로부터의 결과의 예시적인 도표를 도시한다. PBMC, 또는 밤새 FTL3L 세포가 처치된 CD25 고갈된 PBMC는 25 아미노산 길이의 네오항원 서열 (롱머) 또는 에피토프 길이 네오항원 서열 (쇼트머)을 코딩하는 RNA가 전기천공되었다. 배양물 중 네오항원 양성 세포의 백분율은 멀티머 기술을 사용해 어세이하였다.

도 61E는 도 61D에 기술된 실험으로부터의 확장 배수 결과의 예시적인 도표를 도시한다. 밤새 FTL3L 세포가 처치된 CD25 고갈된 PBMC 또는 PBMC는 25 아미노산 길이의 네오항원 서열 (롱머) 또는 에피토프 길이 네오항원 서열 (쇼트머)을 코딩하는 RNA가 전기천공되었다. 배양 및 2자극의 26일 후 세포의 확장 배수가 도시된다.

도 62A는 도 62B-62D에 도시된 실험의 세포가 형질감염된 예시적인 RNA 구성체의 개략도를 도시한다.

도 62B는 X-축 상에 표시된 조합으로 성숙화 이후 26일에 2명 공여자로부터의 ACTN4 및 Gli3 반응성 생 T 세포수의 예시적인 도표를 도시한다.

도 62C는 표시된 성숙화 혼합물의 존재 하에서 성장된 생 세포로부터의 Gli3 반응성 T 세포의 백분율의 예시적인 데이터를 도시한다.

도 62D는 표시된 성숙화 혼합물의 존재 하에서 성장된 Gli3 멀티머 양성 T 세포의 검출을 도시하는 예시적인 유세포측정 데이터를 도시한다.

도 63A는 방사성 동위원소 도입을 사용한 PBMC에 의한 표시된 Gli3 에피토프의 제시의 검출을 보여주는 대표적인 질량 분광법 데이터를 도시한다. 다수 에피토프 (Gli3 에피토프 포함)를 코딩하는 mRNA가 형질감염된 PBMC 및 펩티드의 발현은 더 중량의 동위원소로 표지된 기준 펩티드를 사용해 검출된다.

도 63B는 에피토프의 각각을 코딩하는 mRNA로 PBMC의 형질감염 이후에 시간 경과에 따른 표시된 에피토프의 HLA-A02:01에 의한 최대 제시의 백분율의 예시적인 도표를 도시한다. 각각의 동위원소-표지된 에피토프는 질량 분광법으로 검출되었다. 최대 표면 제시는 형질감염 후 6시간에 관찰되었다.

도 64A는 TNFα 및/또는 IFNɣ 생성에서 백분율 변화 (좌) 또는 APC를 로딩하는데 사용된 표시된 펩티드의 증가 농도로 챌린지된 네오항원 특이적-CD8 T 세포로부터의 CD107a 양성 세포의 백분율 (우)의 리콜 어세이로부터의 예시적인 도표를 도시한다.

도 64B는 TNFα 및/또는 IFNɣ 생성에서 백분율 변화 (좌) 또는 APC를 로딩하는데 사용된 표시된 펩티드의 증가 농도로 챌린지된 네오항원 특이적-CD8 T 세포로부터의 CD107a 양성 세포의 백분율 (우)의 멀티머 어세이로부터의 예시적인 도표를 도시한다.

도 65는 면역원으로서 mRNA를 사용한, 최적 생성물 개인 T 세포 치료제를 생성시키기 위해 고려되는 기준의 예시적인 벤 다이어그램을 도시한다.

도 66은 환자 특이적 T 세포 생성물을 제조하기 위해 펩티드 서열의 선택을 위한 단계를 보여주는 예시적인 흐름도를 도시한다.

도 67은 도 1A에 도시된 과정으로 제조된 T 세포를 사용한 임상 접근법을 위해 유리한 다수 측면을 예시한다.

도 68은 다수의 조작 실행으로 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물의 특징규명을 보여주는 예시적인 대표적 유세포측정을 도시한다. 생 세포의 분율로서 CD3+ (위 패널) 및 생 CD3+ T 세포의 분율로서 CD8+ 및 CD4+ (아래 패널)가 도시된다.

도 69A는 다수의 조작 실행으로 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물의 특징규명을 보여주는 데이터의 예시적인

도표를 도시한다. 멀티머 양성 CD8 양성 세포의 백분율이 표시된다.

도 69B는 다수의 조작 실행으로 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물의 특징규명을 보여주는 예시적인 대표적 유세포측정 데이터를 도시한다. 표시된 에피토프에 대한 멀티머 A 양성 및 멀티머 B 양성 CD8 세포의 백분율이 표시된다.

도 69C는 비로딩된 DC와 비교하여 돌연변이체 네오항원-로딩된 DC로 재-챌린지 시 확인된 $pMHC^{+}$ $CD8^{+}$ T 세포의 다기능성을 보여주는 예시적인 파이 도표를 도시한다.

도 70은 다수의 조작 실행으로 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물의 $CD4^{+}$ 세포에 의한 IFNγ 및/또는 TNFα의 생성에서 변화를 표시하는 대표적인 데이터를 도시한다. 또한 다수 조작 실행으로 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물에서 $IFN\gamma^{+}$ 및/또는 $TNF\alpha^{+}$ 및/또는 $CD107a^{+}$ $CD4^{+}$ 세포의 특징규명을 보여주는 예시적인 대표 데이터를 도시한다.

도 71은 다수 조작 실행에 의해 제조된 환자 특이적 T 세포 생성물에서 중심 기억 T 세포 (T_{cm}), 이펙터 기억 T 세포 (T_{em}), 이펙터 T 세포 (T_{eff}) 및 미경험 T 세포 (T_{naive})의 분율을 보여주는 예시적인 도표를 도시한다. 중심 기억 T 세포 (T_{cm}): $CD62L^{+}$ $CD45RA^{-}$, 이펙터 기억 T 세포 (T_{em}): $CD62L^{-}$ $CD45RA^{-}$, 이펙터 T 세포 (T_{eff}): $CD62L^{-}$ $CD45RA^{+}$, 미경험 T 세포 (T_{naive}): $CD62L^{+}$ $CD45RA^{+}$.

도 72는 샘플 중 펩티드-로딩된 DC의 다양한 농도로 챌린지 시 측정된 총 $CD8^{+}$ 세포 (위 패널) 또는 총 $CD4^{+}$ T 세포 (아래 패널)의 IFN-γ^{+} 및/또는 $TNF\alpha^{+}$ 및/또는 $CD107a^{+}$ 세포의 백분율을 보여주는 멀티머 어세이로부터의 데이터의 예시적인 도표를 도시한다. 그래프 각각에 대해 사용된 펩티드가 도시된다.

도 73은 $CD8^{+}$ T 세포 상의 CD107a (윗줄) 및 종양 세포 상의 활성 캐스파제3 (아랫줄)의 상향조절을 표시하는 데이터의 예시적인 도표를 도시한다. A375 종양 세포주 또는 펩티드-로딩 또는 비로딩된 A375 종양 세포주에서 200 아미노산 구성체가 형질도입 또는 비-형질도입된 공-배양 이후 측정값을 수득하였다.

도 74는 유도된 T 세포가 항원 발현 세포를 사멸시킬 수 있다는 것을 표시하는 데이터의 예시적인 도표를 도시한다. 네오항원-특이적 T 세포는 리콜 반응 어세이를 통해 자기유래 종양 또는 펩티드-로딩된 자기유래 종양을 인식하기 위해 시험되었다. 판독: $pMHC^{+}$ ($CD8^{+}$의 %) 및 $pMHC^{-}$ ($CD8^{+}$의 %) T 세포의 IFN-γ^{+} 및/또는 $TNF\alpha^{+}$ 및/또는 $CD107a^{+}$ (Y 축). 1-측 ANOVA를 사용해 유의성을 지정하였다, $P < 0.05$.

도 75는 임상 연구 (NEO-PTC-01)에 사용을 위한 코호트 및 용량의 예시적인 개략도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101] T 세포 치료는 비교적 안전하고 충분히-내약성인 양자 T 세포 생성물일 것으로 기대된다. 그러나, 생성물과 연관된 위험성의 평가를 기반으로, T 세포 치료제와 연관된 잠재적 독성의 3개 일반 클래스가 존재한다: (a) 림프구고갈, 세포 주입, 또는 사이토카인 방출 증후군으로 인한 치료 관련 독성; (b) 자가반응성 클론의 확장 또는 네오항원 특이적 T 세포의 교차 반응성으로 인한 종양-외, 표적-외 독성; 및 (c) 비-종양 조직 상에 네오항원의 제시로 인한 종양-외, 표적-적중 독성. 본 명세서는 개체의 종양에 고유한 돌연변이 사건으로부터 발생된 네오항원의 발견을 기반으로 신규 면역치료제 및 이의 용도를 기술한다. 따라서, 본 명세서에 기술된 개시는 질환의 치료에서 사용을 위한 항원 특이적 면역 세포, 예를 들어, T 세포를 생성시키는 방법 및 프로토콜을 제공한다.

[0102] 본 명세서는 암 면역요법을 위한 네오항원 반응성 T 세포의 조성물을 제시한다. 양자 T 세포 요법이 암 요법을 위한 유망한 새로운 접근법이지만 몇가지 개선을 요구한다. 일반적으로, T 세포는 암 세포에 적절하게 세포독성이어야 하고, 체내 비-암 세포에는 해를 가야지 않아야 하고, 종양 환경에서 면역원성을 상실하지 말아야 하며 장기간 보호를 제공해야 한다. 추가로, 바이러스 형질도입된 세포의 사용은 그 자체로 도전이다. 그러므로, 암 세포를 특이적으로 표적화하는 치료적으로 유효한 조성물을 획득하도록 올바른 균형을 유지하고, 건강한 세포를 보존하고, 질환의 진행을 정지시키거나, 경감시키거나 또는 적어도 실질적 종양 퇴행을 야기시키고 암의 재발을 방지하는 것은 복잡한 과정의 거의 모든 단계에서 몇가지 개선을 요구한다.

[0103] 본 개시의 이해를 용이하게 하기 위해서, 다수의 용어 및 어구가 하기에 정의된다.

[0104] 항원은 면역 반응을 유도하는 신체에 대한 외래 물질이다. "네오항원"은 단백질 중 종양-특이적 변화로부터 발생된 종양 항원 클래스를 의미한다. 네오항원은 예를 들어, 단백질 서열 내 치환, 프레임 시프트 돌연변이, 융합 폴리펩티드, 인-프레임 결실, 삽입, 및 내생성 레트로바이러스 폴리펩티드의 발현으로부터 발생된 종양 항원을 포괄하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0105] "네오에피토프"는 기준, 예컨대 비-질환 세포, 예를 들어 비-암성 세포 또는 배선 세포에 존재하지 않지만, 질환 세포, 예를 들어 암 세포에서 발견되는 에피토프를 의미한다. 이것은 상응하는 에피토프가 정상의 비-질환 세포 또는 배선 세포에서 발견되지만, 질환 세포, 예를 들어 암 세포 내 하나 이상의 돌연변이에 기인하여, 에피토프의 서열은 네오에피토프를 생성시키도록 변화되는 상황을 포함한다.

[0106] "돌연변이"는 기준 핵산과 비교하여 핵산 서열 내 변화 또는 편차 (예를 들어, 뉴클레오티드 치환, 첨가 또는 결실)을 의미한다. "체세포 돌연변이"는 생식 세포 (정자 및 난자)를 제외한 신체의 임의 세포에서 일어날 수 있지만 어린이에게 전달되지는 않는다. 이들 변경은 암 또는 다른 질환을 야기할 수 없다 (그러나 항상은 아님). 일부 실시형태에서, 돌연변이는 비-동의 돌연변이이다. "비-동의 돌연변이"는 번역 생성물 내 아미노산 변화 예컨대 아미노산 치환을 일으키는, 돌연변이 (예를 들어, 뉴클레오티드 치환)를 의미한다. "프레임시프트"는 비-천연 단백질 서열의 변형을 일으키는, 유전자의 코돈 주기성 ("리딩 프레임"이라고도 알려짐)의 정상 단계를 파괴할 때 일어난다. 유전자 내 상이한 돌연변이는 동일한 변경된 리딩 프레임을 획득하는 것이 가능하다.

[0107] "항원 프로세싱" 또는 "프로세싱"은 상기 폴리펩티드 또는 항원의 단편인 프로세싱 생성물로의 폴리펩티드 또는 항원의 분해 (예를 들어, 펩티드로 폴리펩티드의 분해) 및 특이적 T 세포에 대한 세포, 예를 들어 항원 제시 세포에 의한 제시를 위해 MHC 분자와 이들 단편 중 하나 이상의 회합 (예를 들어, 결합을 통함)을 의미한다.

[0108] "항원 제시 세포" (APC)는 이의 세포 표면 상의 MHC 분자와 회합된 단백질 항원의 펩티드 단편을 제시하는 세포를 의미한다. 이 용어는 전문적인 항원 제시 세포 (예를 들어, B 림프구, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포)를 비롯하여 다른 항원 제시 세포 (예를 들어, 케라타노사이트, 내피 세포, 성상세포, 섬유아세포, 희소돌기아교세포)를 포함한다.

[0109] 용어 "친화성"은 결합 쌍의 2개 구성원 (예를 들어, 인간 백혈구 항원 (HLA)-결합 펩티드 및 클래스 I 또는 II HLA, 또는 펩티드-HLA 복합체 및 T 세포 수용체 (TCR)) 간 결합의 강도의 측정치를 의미한다. K_D는 결합쌍의 2개 구성원 간 해리 상수를 의미하고 몰농도의 단위를 갖는다. K_A는 결합쌍의 2개 구성원 간 친화성 상수를 의미하고 해리 상수에 반비례한다. 친화성은 실험적으로, 예를 들어 상업적으로 입수가능한 Biacore SPR 유닛을 사용하는 표면 플라스몬 공명 (SPR)을 통해 결정할 수 있다. K_{off}는 결합쌍의 2개 구성원의 해리-속도 상수 (예를 들어, HLA-결합 펩티드 및 클래스 I 또는 II HLA, 또는 펩티드-HLA 복합체 및 TCR의 해리-속도 상수)를 의미한다. K_{on}은 결합쌍의 2개 구성원의 결합-속도 상수 (예를 들어, HLA-결합 펩티드 및 클래스 I 또는 II HLA, 또는 펩티드-HLA 복합체 및 TCR의 결합-속도 상수)를 의미한다.

[0110] 본 개시 전반에서, "결합 데이터" 결과는 "IC_{50}"의 용어로 표현된다. 친화성은 또한 억제 농도 50 (IC_{50})으로서, 또는 결합쌍의 제1 구성원 (예를 들어, 펩티드)의 50%가 대체되는 농도로서 표현될 수 있다. 유사하게, $\ln(IC_{50})$은 IC_{50}의 자연 로그를 의미한다. 예를 들어, IC_{50}은 표지된 기준 펩티드의 결합의 50% 억제가 관찰되는 결합 어세이에서의 시험된 펩티드의 농도일 수 있다. 어세이가 실행되는 조건 (예를 들어, 제한된 HLA 단백질 농도 및/또는 표지된 기준 펩티드 농도)을 고려하면, 이들 값은 K_D 값을 어림잡을 수 있다. 결합을 결정하기 위한 어세이는 당분야에 충분히 공지되어 있고, 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 94/20127 및 WO 94/03205, 및 다음과 같은 다른 공개물에 상술되어 있다: Sidney et al., Current Protocols in Immunology 18.3.1 (1998); Sidney, et al., J. Immunol. 154:247 (1995); 및 Sette, et al., Mol. Immunol. 31:813 (1994). 대안적으로, 결합은 기준 표준 펩티드에 의한 결합에 대해서 표현될 수 있다. 결합은 또한 다음의 것들을 사용하는 것을 포함하여 다른 어세이 시스템을 사용해 결정될 수 있다: 생 세포 (예를 들어, Ceppellini et al., Nature 339:392 (1989); Christnick et al., Nature 352:67 (1991); Busch et al., Int. Immunol. 2:443 (1990); Hill et al., J. Immunol. 147:189 (1991); del Guercio et al., J. Immunol. 154:685 (1995)), 세제 용해물을 사용한 무세포 시스템 (예를 들어, Cerundolo et al., J. Immunol. 21:2069 (1991)), 고정된 정제 MHC (예를 들어, Hill et al., J. Immunol. 152, 2890 (1994); Marshall et al., J. Immunol. 152:4946 (1994)), ELISA 시스템 (예를 들어, Reay et al., EMBO J. 11:2829 (1992)), 표면 플라스몬 공명 (예를 들어, Khilko et al., J. Biol.

Chem. 268:15425 (1993)); 고흐름 가용상 어세이 (Hammer et al., J. Exp. Med. 180:2353 (1994)), 및 클래스 I MHC 안정화 또는 조립의 측정 (예를 들어, Ljunggren et al., Nature 346:476 (1990); Schumacher et al., Cell 62:563 (1990); Townsend et al., Cell 62:285 (1990); Parker et al., J. Immunol. 149:1896 (1992)).

[0111] 에피토프를 논의하기 위해 사용될 때 용어 "유래된"은 "제조된"과 동의어이다. 유래된 에피토프는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 또는 당분야의 표준 프로토콜에 따라 합성될 수 있다. 합성 에피토프는 인공 아미노산 잔기 "아미노산 모방체", 예컨대 천연 발생 L 아미노산 잔기의 D 이성질체 또는 비천연 아미노산 잔기 예컨대 시클로헥실알라닌을 포함할 수 있다. 유래되거나 또는 제조된 에피토프는 천연 에피토프의 유사체일 수 있다. 용어 "~로부터 유래된"은 기원 또는 공급원을 의미하고, 천연 발생, 재조합, 비정제, 정제 또는 분화된 분자 또는 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 확장되거나 또는 유도된 항원 특이적 T 세포는 T 세포로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 확장되거나 또는 유도된 항원 특이적 T 세포는 생물학적 샘플 중 항원 특이적 T 세포로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 성숙 APC (예를 들어, 전문 APC)는 비-성숙 APC (예를 들어, 미성숙 APC)로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, APC는 단핵구 (예를 들어, $CD14^+$ 단핵구)로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 수지상 세포는 단핵구 (예를 들어, $CD14^+$ 단핵구)로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, APC는 골수 세포로부터 유래될 수 있다.

[0112] "에피토프"는 다른 분자 (예를 들어, 면역글로불린, T 세포 수용체, HLA 분자, 또는 키메라 항원 수용체)에 의해 인식되는 부위를 함께 형성하는 분자의 집합적 특성 (예를 들어, 펩티드의 전하 및 1차, 2차, 및 3차 구조)이다. 예를 들어, 에피토프는 특정 면역글로불린; 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 수용체; 또는 T 세포의 경우에, T 세포 수용체 단백질 및/또는 키메라 항원 수용체에 의해 인식되는 잔기들에 의한 인식에 관여되는 아미노산 잔기의 세트일 수 있다. 에피토프는 천연 공급원으로부터 단리에 의해 제조될 수 있거나, 또는 그들은 당분야의 표준 프로토콜에 따라서 합성될 수 있다. 합성 에피토프는 인공 아미노산 잔기, 아미노산 모방체 (예컨대, 천연 발생 L 아미노산 잔기의 D 이성질체 또는 비천연 발생 아미노산 잔기)를 포함할 수 있다. 본 개시를 통해서, 에피토프는 일부 경우에 펩티드들 또는 펩티드 에피토프를 의미할 수 있다. 일정 실시형태에서, 본 개시의 펩티드의 길이에 제한이 존재한다. 길이-제한이 일어나는 실시형태는 본 명세서에 기술된 에피토프를 포함하는 단백질 또는 펩티드가 천연 서열과 100% 동일성을 갖는 영역 (즉, 아미노산 잔기의 연속 시리즈)을 포함할 때이다. 읽으면서 에피토프의 정의를 피하기 위해, 예를 들어, 전체 천연 분자 상에서, 천연 펩티드 서열과 100% 동일성을 갖는 임의 영역의 길이 상에 제한이 존재한다. 따라서, 본 명세서에 기술된 에피토프 및 천연 펩티드 서열과 100% 동일성을 갖는 영역을 포함하는 펩티드 경우에, 천연 서열과 100% 동일성을 갖는 영역은 일반적으로 600 아미노산 잔기 이하, 500 아미노산 잔기 이하, 400 아미노산 잔기 이하, 250 아미노산 잔기 이하, 100 아미노산 잔기 이하, 85 아미노산 잔기 이하, 75 아미노산 잔기 이하, 65 아미노산 잔기 이하, 및 50 아미노산 잔기 이하의 길이를 갖는다. 일정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 "에피토프"는 천연 펩티드 서열과 100% 동일성을 갖는 51 아미노산 잔기 미만으로, 5 아미노산 잔기까지 아래로 임의 증분으로, 예를 들어 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 아미노산 잔기를 갖는 영역을 갖는 펩티드에 의해 포함된다.

[0113] "T 세포 에피토프"는 펩티드-MHC (pMHC) 복합체의 형태로 MHC 분자에 의해 결합된 펩티드 서열을 의미한다. 펩티드-MHC 복합체는 T 세포 (예를 들어, 세포독성 T-림프구 또는 T-헬퍼 세포)의 TCR에 의해 인식 및 결합될 수 있다.

[0114] "T 세포"는 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 용어 T 세포는 T 헬퍼 1형 T 세포 및 T 헬퍼 2형 T 세포 둘 모두를 포함한다. T 세포는 임상 적용을 위해서, 본 출원에서 기술되는 방법으로 생성될 수 있다. 여기서, 예컨대 임상 적용을 위해 지칭되는 T 세포 또는 양자 T 세포는 생물학적 공급원으로부터 단리되어 생체외에서 조작 및 배양되고 특이적 요법 예컨대 암, 예를 들어 흑색종에 대한 약물 후보로 제조되는 세포이다. 약물 후보 세포가 임상 적용을 위한 적합성에 대한 특별한 정성적 및 정량적 기준을 통과할 때, 약물 후보는 약물 생성물로 지정될 수 있다. 일부 경우에, 약물 생성물은 수많은 약물 후보로부터 선택된다. 본 출원의 상황에서, 약물 생성물은 T 세포, 보다 특히, T 세포의 개체군, 또는 보다 특별히 이종성 특징 및 아형을 갖는 T 세포의 개체군이다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 약물 생성물은 특히 CD8+ T 세포, CD4+ T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 가질 수 있고, 적어도 소정 이상의 세포는 항원 특이성을 나타내고, 각각의 소정 비율은 특히 기억 표현형을 나타낸다.

[0115] "면역 세포"는 면역 반응에서 역할을 하는 세포를 의미한다. 면역 세포는 조혈 기원의 것이고, 림프구, 예컨대

B 세포 및 T 세포; 자연 살해 세포; 골수 세포, 예컨대 단핵구, 마크로파지, 호산구, 비만 세포, 호염기구, 및 과립구를 포함한다.

[0116] "면역원성" 펩티드 또는 "면역원성" 에피토프 또는 "면역원성" 펩티드 에피토프는 HLA 분자에 결합하는 펩티드이고 세포-매개 또는 체액성 반응, 예를 들어, 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응, 헬퍼 T 림프구 (HTL) 반응 및/또는 B 림프구 반응을 유도한다. 본 명세서에 기술된 면역원성 펩티드는 HLA 분자에 결합할 수 있고 이후에 펩티드에 대해 세포-매개 또는 체액성 반응 (예를 들어, CTL (세포독성) 반응, 또는 HTL 반응)을 유도한다.

[0117] "보호적 면역 반응" 또는 "치료적 면역 반응"은 일부 방식으로 질환 증상, 부작용 또는 진행을 방지하거나 또는 적어도 부분적으로 정지시키는, 병원성 항원 (예를 들어, 종양 항원)으로부터 유래된 항원에 대한 CTL 및/또는 HTL 반응을 의미한다. 면역 반응은 또한 헬퍼 T 세포의 자극에 의해 촉진된 항체 반응을 포함할 수 있다.

[0118] "T 세포 수용체" ("TCR")는 천연 또는 부분적으로 또는 전체로 합성되어 생성되었는지 여부와 무관하게, 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 T 림프구 (T 세포)의 표면 상에서 발견되는 분자를 의미한다. 다양한 질환 (예를 들어, 암) 또는 감염성 유기체와 회합된 항원을 인식하는 T 세포의 능력은 알파 (α) 사슬 및 베타 (β) 사슬 또는 감마 (ɣ) 및 델타 (δ) 사슬로 구성된, 이의 TCR에 의해 부여된다. 이들 사슬로 구성된 단백질은 엄청난 다양성의 TCR을 생성시키기 위한 고유 기전을 적용하는, DNA에 의해 코딩된다. 이러한 다수-서브유닛 면역 인식 수용체는 CD3 복합체와 회합되고 항원-제시 세포 (APC)의 표면 상에서 MHC 클래스 I 및 II 단백질에 의해 제시된 펩티드에 결합된다. APC 상의 펩티드에 대한 TCR의 결합은 T 세포 활성화에서 중요한 사건이다.

[0119] 본 명세서에서 사용되는, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역글로불린 항원 결합 도메인 (예를 들어, 면역글로불린 가변 도메인) 및 T 세포 수용체 (TCR) 불변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는, TCR 폴리펩티드의 "불변 도메인"은 막-근위 TCR 불변 도메인, TCR 경막 도메인 및/또는 TCR 세포질 도메인, 또는 이의 단편을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, CAR은 TCRβ 불변 도메인에 연결된 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 단량체이다. 일부 실시형태에서, CAR은 TCRα 또는 TCRβ 불변 도메인에 연결된 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 TCRβ 또는 TCRα 불변 도메인에 연결된 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 (예를 들어, κ 또는 λ 가변 도메인)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이량체이다.

[0120] "주요 조직적합성 복합체" 또는 "MHC"는 생리적 면역 반응을 담당하는 세포 상호작용의 제어에서 역할을 하는 유전자 클러스터이다. 용어 "주요 조직적합성 복합체" 및 약어 "MHC"는 임의 클래스의 MHC 분자, 예컨대 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 분자를 포함할 수 있고 모든 척추동물에서 존재하는 유전자의 복합체와 관련된다. 인간에서, MHC 복합체는 또한 인간 백혈구 항원 (HLA) 복합체로서 알려져 있다. 따라서, "인간 백혈구 항원" 또는 "HLA"는 인간 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 단백질을 의미한다 (예를 들어, [Stites, et al., Immunology, 8TH Ed., Lange Publishing, Los Altos, Calif. (1994)] 참조. MHC 및 HLA 복합체의 상세한 설명을 위해, [Paul, Fundamental Immunology, 3rd Ed., Raven Press, New York (1993)] 참조).

[0121] 게놈 내 주요 조직적합성 복합체는 세포 표면 상에서 발현되는 그의 유전자 생성물이 내생성 및/또는 외래 항원에 결합하고 제시하여 면역학적 과정을 조절하는데 중요한 유전자 영역을 포함한다. MHC 단백질 또는 분자는 면역 반응에서 림프구 및 항원 제시 세포 또는 질환 세포 간 신호전달에 중요한다. MHC 단백질 또는 분자는 펩티드에 결합하고 T-세포 수용체에 의한 인식을 위해 그들을 제시한다. MHC에 의해 코딩되는 단백질은 세포의 표면 상에서 발현될 수 있고, 자기-항원 (세포 그 자체로부터의 펩티드 단편) 및 비-자기-항원 (예를 들어, 침입 미생물의 단편) 둘 모두를 T-세포에게 전시한다. MHC 결합 펩티드는 단백질 항원의 단백질가수분해적 절단으로 생성될 수 있고 잠재적 림프구 에피토프 (예를 들어, T 세포 에피토프 및 B 세포 에피토프)를 대표할 수 있다. MHC는 펩티드를 세포 표면으로 수송할 수 있고 그들을 거기서 특이적 세포, 예컨대 세포독성 T-림프구, T-헬퍼 세포, 또는 B 세포에게 제시할 수 있다. MHC 영역은 3개 서브그룹, 클래스 I, 클래스 II, 및 클래스 III로 분류될 수 있다. MHC 클래스 I 단백질은 α-사슬 및 β2-미크로글로불린 (염색체 15에 의해 코딩되는 MHC의 일부가 아님)을 함유할 수 있다. 그들은 세포독성 T-세포에게 항원 단편을 제시할 수 있다. MHC 클래스 II 단백질은 α-사슬 및 β-사슬을 함유할 수 있고 그들은 T-헬퍼 세포에게 항원 단편을 제시할 수 있다. MHC 클래스 III 영역은 다른 면역 성분, 예컨대 보체 성분 및 사이토카인을 코딩할 수 있다. MHC는 다유전자 (몇개의 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 유전자가 존재) 및 다형체 (각 유전자의 다수 대립유전자 존재) 둘 모두일 수 있다.

[0122] "수용체"는 리간드에 결합할 수 있는 생물학적 분자 또는 분자단을 의미한다. 수용체는 세포, 세포 형태 또는

유기체에서 정보를 전달하도록 제공될 수 있다. 수용체는 적어도 하나의 수용체 단위를 포함하고, 예를 들어 각각의 수용체 단이는 단백질 분자로 이루어질 수 있다. 수용체는 리간드의 것을 보완하는 구조를 갖고 결합 파트너로서 리간드와 복합체를 형성할 수 있다. 정보는 세포의 표면 상에서 리간드의 복합체화 이후에 특히 수용체의 입체배열 변화를 통해서 전달된다. 일부 실시형태에서, 수용체는 특히 수용체/리간드 복합체와 리간드, 특히 적합한 길이의 펩티드 또는 펩티드 단편을 형성할 수 있는 MHC 클래스 I 및 II의 단백질을 의미하는 것으로 이해해야 한다. "리간드"는 수용체의 것에 상보적인 구조를 가지며 이러한 수용체와 복합체를 형성할 수 있는 분자를 의미한다. 일부 실시형태에서, 리간드는 적합한 길이 및 이의 아미노산 서열에 적합한 결합 모티프를 가져서, 그 펩티드 또는 펩티드 단편이 MHC 단백질 예컨대 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 단백질과 복합체를 형성할 수 있는 것인 펩티드 또는 펩티드 단편을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 일부 실시형태에서, "수용체/리간드 복합체"는 또한 펩티드- 또는 펩티드 단편-제시 MHC 분자 예컨대 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자를 포함하는, "수용체/펩티드 복합체" 또는 "수용체/펩티드 단편 복합체"를 의미하는 것으로 이해해야 한다.

[0123] "천연" 또는 "야생형" 서열은 자연계에 존재하는 서열을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "천연 발생"은 객체가 자연계에 존재할 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 유기체 (바이러스 포함)에 존재하고 자연계 공급원으로부터 단리될 수 있으며 실험실에서 인간이 의도적으로 변형시키지 않은 펩티드 또는 핵산은 천연 발생이다.

[0124] 용어 "펩티드" 및 "펩티드 에피토프"는 전형적으로 인접한 아미노산 잔기의 α-아미노 및 카르복실 기 간 펩티드 결합을 통해서, 서로에게 연결된 일련의 잔기를 명명하기 위해서 본 명세서에서 "올리고펩티드"와 상호교환적으로 사용된다. "합성 펩티드"는 비-천연 발생으로부터 수득한, 예를 들어 인간이 만든 펩티드를 의미한다. 이러한 펩티드는 화학 합성 또는 재조합 DNA 기술같은 방법을 사용해 생성될 수 있다. "합성 펩티드"는 "융합 단백질"을 포함한다.

[0125] 용어 "모티프"는 정해진 길이의 아미노산 서열 내 잔기의 패턴, 예를 들어, 약 15 아미노산 잔기 미만의 길이, 또는 약 13 아미노산 잔기 미만의 길이, 예를 들어, 클래스 I HLA 모티프의 경우 약 8 내지 약 13 아미노산 잔기 (예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13) 및 특정 HLA 분자에 의해 인식되는 클래스 II HLA 모티프의 경우 약 6 내지 약 25 아미노산 잔기 (예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25)의 펩티드를 의미한다. 모티프는 전형적으로 소정 HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 각각의 HLA 단백질에 대해 상이하다. 이들 모티프는 1차 및 2차 앵커 잔기의 그들 패턴이 상이하다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 모티프는 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13 아미노산 잔기의 길이의 펩티드로 확인된다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 II 모티프는 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 아미노산 잔기의 길이의 펩티드로 확인된다. "교차-반응 결합" 펩티드는 결합쌍 구성원의 클래스의 하나 초과의 구성원에 결합하는 펩티드 (예를 들어, 클래스 I HLA 분자 및 클래스 II HLA 분자 둘 모두에 의해 결합되는 펩티드)를 의미한다.

[0126] 용어 "잔기"는 아미드 결합 또는 아미드 결합 모방체에 의해 펩티드 또는 단백질에 도입되거나, 또는 핵산 (DNA 또는 RNA)에 의해 코딩되는, 아미노산 잔기 또는 아미노산 모방체 잔기를 의미한다. 펩티드 또는 단백질을 기술하기 위해 사용되는 명명법은 통상의 관례를 따른다. 아미노 기는 좌측 (아미노- 또는 N-말단)에 존재하고 카르복실 기는 각 아미노산 잔기의 우측 (카르복시- 또는 C-말단)에 존재한다. 아미노산 잔기 위치가 펩티드 에피토프에서 지칭될 때 그들은 아미노에서 카르복실 방향으로 번호매겨지는데 제1 위치는 에피토프, 또는 그것이 일부일 수 있는 펩티드 또는 단백질의 아미노 말단부에 위치된 잔기이다. 본 발명의 선택된 특정 실시형태를 나타내는 식에서, 아미노- 및 카르복실-말단 기는, 특별히 표시되지 않지만, 달리 명시하지 않으면, 그들이 생리적 pH 값에서 추정되는 형태이다. 아미노산 구조 식에서, 각 잔기는 일반적으로 표준 3글자 또는 1글자 명칭으로 표시된다. 아미노산 잔기의 L-형태는 대문자 1글자 또는 3글자 기호의 대문자 첫번째 글자로 표시되고, D-형태를 갖는 아미노산 잔기의 D-형태는 소문자 1글자 또는 소문자 3글자 기호로 표시된다. 그러나, 3글자 기호 또는 전체 명칭이 대문자없이 사용될 때, 그들은 L 아미노산 잔기를 의미할 수 있다. 글리신은 비대칭 탄소 원자를 갖지 않고 단순히 "Gly" 또는 "G"로서 지칭된다. 본 명세서에 기재된 펩티드의 아미노산 서열은 일반적으로 표준 1글자 기호를 사용해 명명된다 (A, 알라닌; C, 시스테인; D, 아스파르트산; E, 글루탐산; F, 페닐알라닌; G, 글리신; H, 히스티딘; I, 이소류신; K, 리신; L, 류신; M, 메티오닌; N, 아스파라긴; P, 프롤린; Q, 글루타민; R, 아르기닌; S, 세린; T, 트레오닌; V, 발린; W, 트립토판; 및 Y, 티로신).

[0127] "보존성 아미노산 치환"은 한 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레

오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여, 당분야에서 정의되어 있다. 예를 들어, 페닐알라닌의 티로신으로의 치환이 보존성 치환이다. 펩티드 기능을 제거하지 않는 뉴클레오티드 및 아미노산 보존성 치환을 확인하는 방법은 당분야에 충분히 공지되어 있다.

[0128] "약학적으로 허용되는"은 일반적으로, 무독성, 불활성, 및/또는 생리적으로 상용성인 조성물 또는 조성물의 성분을 의미한다. "약학 부형제" 또는 "부형제"는 물질 예컨대 보강제, 담체, pH-조절 및 완충제, 등장성 조절제, 습윤제, 보존제 등을 포함한다. "약학 부형제"는 약학적으로 허용되는 부형제이다.

[0129] 본 개시에 따라서, 용어 "백신"은 투여시에, 병원체 또는 질환 세포 예컨대 암 세포를 인식하여 공격하는, 면역반응, 예를 들어, 세포 또는 체액성 면역 반응을 유도하는 약학 조제물 (약학 조성물) 또는 생성물을 의미한다. 백신은 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 용어 "개별화된 암 백신" 또는 "개인화된 암 백신", "개인 암 백신"은 특정 암 환자를 고려하고 암 백신이 개별 암 환자의 요구 또는 특별한 상황에 조정된 것을 의미한다.

[0130] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 임의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 의미하며, DNA 및 RNA, 예를 들어, mRNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 중합체로 도입될 수 있는 임의 기질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 및 핵산은 시험관내 전사된 mRNA일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법을 사용해 투여되는 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0131] 용어 "단리된" 또는 "생물학적으로 순수한"은 이의 천연 상태에서 존재하는 바와 같이 정상적으로 물질을 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 따라서, 본 명세서에 기술된 단리된 펩티드는 그들의 원 위치 환경에서 펩티드와 정상적으로 회합된 물질의 일부 또는 전부를 함유하지 않는다. 예를 들어, "단리된" 에피토프는 에피토프가 유래된 단백질의 전체 서열을 포함하지 않는 에피토프일 수 있다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 천연-발생 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드는 단리되지 않지만, 천연 시스템에서 함께 존재하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리된, 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이러한 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드는 조성물의 일부일 수 있고, 이러한 벡터 또는 조성물이 이의 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 "단리된다". 단리된 RNA 분자는 본 명세서에 기술된 DNA 분자의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사물을 포함하고, 합성적으로 생성된 이러한 분자를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순도 (즉, 오염물 없음), 적어도 90% 순도, 적어도 95% 순도, 적어도 98% 순도, 또는 적어도 99% 순도인 물질을 의미한다.

[0132] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 상황에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 아미노산 치환을 고려하지 않고, 최적 상응도에 대해 비교 및 정렬 (필요하면, 갭 도입)시켰을 때, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 특정 백분율을 갖거나 또는 동일한 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다. 동일성 백분율은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하거나 또는 육안 검사를 통해서 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하는데 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 당분야에 충분히 공지되어 있다. 이들은 BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG 및 위스콘신 패키지, 및 이의 별형을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 2개 핵산 또는 폴리펩티드는 실질적으로 동일하고, 그들이 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 또는 육안 검사를 통해서 측정하여, 최대 상응도로 비교 및 정렬했을 때, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 일부 실시형태에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 동일성은 적어도 약 10, 적어도 약 20, 적어도 약 40-60 잔기, 적어도 약 60-80개의 잔기의 길이 또는 이 사이의 임의의 정수값의 길이인 서열의 영역 상에 존재한다. 일부 실시형태에서, 동일성은 60-80개의 잔기 초과의 영역, 예컨대 적어도 약 80-100개의 잔기 상에 존재하고, 일부 실시형태에서, 서열은 뉴클레오티드 서열의 코딩 영역 또는 펩티드의 아미노산 서열같은, 비교되는 서열의 전체 길이 상에서 실질적으로 동일하다.

[0133] 용어 "대상체"는 특정 치료의 수령체가 되는, 제한없이, 인간, 인간이외의 영장류, 개, 고양이, 설치류 등을 포함한 임의 동물 (예를 들어, 포유동물)을 의미한다. 전형적으로, 용어 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체에 대해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0134] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량" 또는 "치료적 효과"는 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료

하는데" 유효한 치료제의 양을 의미한다. 약물의 치료적 유효량은 치료적 효과를 가지며 이와 같이 따라서 질환 또는 장애의 발생을 예방할 수 있거나; 질환 또는 장애의 발생을 둔화시키거나; 질환 또는 장애의 진행을 둔화시키거나; 질환 또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 어느 정도로 완화시키거나; 이환율 및 사망률을 감소시키거나; 삶의 질을 개선시키거나; 또는 이러한 효과의 조합일 수 있다.

[0135] 용어 "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위한" 또는 "경감시키는" 또는 "경감시키기 위한"은 (1) 진단된 병리학적 병태 또는 장애의 증상을 치유, 둔화, 축소시키고/시키거나, 진행을 중지시키는 치료적 척도, 및 (2) 표적화된 병리학적 병태 또는 장애의 발생을 예방 또는 지연시키는 예방학적 또는 예방적 척도 둘 모두를 의미한다. 따라서, 치료를 필요로 하는 것들은 이미 장애를 갖는 것들; 장애를 가질 경향이 있는 것들; 및 장애를 예방해야 하는 것들을 포함한다.

[0136] 세포 샘플 (예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플)을 기술하는데 사용될 때 용어 "고갈된"은 세포의 하위개체군이 제거 또는 고갈된 세포 샘플을 의미한다. 예를 들어, CD25 발현 세포가 고갈된 면역 세포 샘플은 CD25 발현 세포가 제거 또는 고갈된 면역 세포 샘플을 의미한다. 예를 들어, 하나 이상의 결합제는 하나 이상의 세포 또는 세포 유형을 샘플로부터 제거 또는 고갈시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, $CD14^+$ 세포는 예컨대 CD14에 결합하는 항체를 사용하여, PBMC 샘플로부터 고갈 또는 제거될 수 있다.

[0137] "자극"은 이의 동족 리간드와 자극성 분자의 결합에 의해 유도되어, 신호 전달 사건을 매개하는 반응을 의미한다. 예를 들어, T 세포의 자극은 펩티드-MHC 복합체에 대한 T 세포의 TCR의 결합을 의미할 수 있다. 예를 들어, T 세포의 자극은 PBMC가 펩티드 로딩된 APC와 함께 배양되는 프로토콜 1 또는 프로토콜 2 내의 단계를 의미할 수 있다.

[0138] 용어 "농축된"은 목적 종이 부분적으로 정제되어서 목적 종의 농도가 농축없는 최종 생성물 중 종의 천연 발생 수준에 비해서 실질적으로 더 높은 조성물 또는 분획을 의미한다. 용어 "유도된 세포"는 세포의 단백질 발현, 유전자 발현, 분화 상태, 형상, 몰폴로지, 생존능 등에 영향을 미치는 유도성 화합물, 세포, 또는 세포의 개체군으로 처치된 세포를 의미한다.

[0139] "기준"은 질환 표본으로부터 본 개시의 방법에서 수득된 결과를 상관짓고/짓거나 비교하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, "기준"은 개체 또는 하나 이상의 상이한 개체 (예를 들어, 건강한 개체), 예컨대 동일 종의 개체로부터 수득된, 하나 이상의 정상 표본, 특히 질환에 의해 영향받지 않은 표본을 기반으로 수득될 수 있다. "기준"은 충분히 많은 수의 정상 표본을 시험하여 실증적으로 결정될 수 있다.

[0140] 달리 언급하지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 종양은 암성 종양이고, 용어 암 및 종양은 본 문서 전반에서 상호교환적으로 사용된다. 종양은 고형 조직의 암이지만, 본 명세서에 기술된 몇몇 조성물 및 방법은 원칙적으로 혈액의 암, 백혈병에 적용가능하다.

[0141] **T 세포 요법의 개요**

[0142] T 세포 (예를 들어, 자기유래 T 세포)의 제어된 생체외 유도 또는 확장에 의한 항원 특이적 T 세포의 생성은 고도로 특이적이고 유리한 T 세포 요법 (예를 들어, 양자 T 세포 요법)을 제공할 수 있다. 본 개시는 암 및 다른 병태, 질환 및 장애를 갖는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있는 T 세포 제조 방법 및 치료적 T 세포 조성물을 제공한다. 목적은 바람직한 표현형 및 기능을 갖는 항원 특이적 T 세포를 확장시키고 유도시키는 것이다. 본 개시는 항원 특이적 T 세포 요법 (예를 들어, 개인 또는 개인화 T 세포 요법)에 사용할 수 있는 T 세포의 조성물 및 제조 방법을 제공한다. 본 명세서에 제공되는 T 세포 조성물은 개인 항원 특이적 T 세포 요법일 수 있다. 도 1은 한편으로, 암을 갖는 대상체에서 암 및 암 특이적 항원을 확인하여, 네오항원성 펩티드의 생성을 야기시키는 단계; 및 다른 한편으로, 면역요법을 위한 활성화된, 항원 특이적 세포를 제조하고 세포 생성물을 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 요법과 관련된 과정의 개요를 도표적으로 나타낸다.

[0143] **T 세포-기반 요법을 위한 네오항원**

[0144] 전통적인 항원-표적화 면역요법은 종양 연관 항원 (TAA), 암 고환 항원 (전형적으로 종양에서 이상적으로 발현되는 배선 제한 유전자 생성물)을 포함한 항원 또는 조직 특이적 발현을 보이는 유전자로부터 유래된 항원에 집중하였다. 그러나, 종양은 또한 네오항원이라고 불리는 돌연변이된 유전자의 단백질 생성물을 전시한다. 돌연변이의 수 및 유형은 차세대 서열분석 접근법을 사용해 쉽게 정의될 수 있고 단일 아미노산 미스센스 돌연변이, 융합 단백질, 및 1 내지 100개 이상의 아미노산의 길이로 다양한 신규 오픈 리딩 프레임 (neoORF)을 포함한다. 네오항원은 에피토프 내 비-침묵 돌연변이를 포함하는 항원이고, 동일한 항원은 동일한 인간 체내 비-암 세포에

서 발현되지 않는다. 돌연변이-기반 항원은 특히 가치있는데 이들은 중추 내성 (자가-반응성 T 세포의 제거의 정상 흉선 발생 동안 일어나는 과정)을 우회하고 정교한 종양 특이성을 입증한다. 각각의 비동의성 (즉, 단백질 코딩) 돌연변이는 환자의 T 세포에 의해 인식될 수 있는 네오항원을 생성시키는 잠재성을 갖는다. 이들 네오항원을 인식하는 T 세포는 종양 세포를 직접적으로 사멸시키고 종양에 대하여 더 넓은 면역 반응을 촉매하는 기능을 할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 환자-특이적 방식으로 이러한 네오항원-반응성 T 세포를 유도시키고 확장시켜서 양자 세포 요법을 위해 이들 세포를 이용하는 것을 목표로 한다.

[0145] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 네오항원은 점 돌연변이를 포함한다.

[0146] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 네오항원은 프레임시프트 돌연변이를 포함한다.

[0147] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 네오항원은 교차 돌연변이를 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 네오항원은 하나 또는 하나 초과의 뉴클레오티드의 삽입에 의해 초래되는, 삽입 돌연변이를 포함한다.

[0149] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 네오항원은 하나 또는 하나 초과의 뉴클레오티드의 결실에 의해 초래되는, 결실 돌연변이를 포함한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 네오항원은 삽입-결실 (in-del) 돌연변이에 의해 초래될 수 있다.

[0151] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 HLA 단백질 (예를 들어, HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II)에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 상응하는 야생형 펩티드에 비해 더 큰 친화성으로 HLA 단백질에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 적어도 5000 nM 미만, 적어도 500 nM 미만, 적어도 100 nM 미만, 적어도 50 nM 또는 그 미만의 IC_{50} 또는 K_D를 갖는다.

[0152] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기의 길이, 또는 약 8 내지 약 30, 약 8 내지 약 20, 약 8 내지 약 18, 약 8 내지 약 15, 또는 약 8 내지 약 12개의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 약 8 내지 약 500개의 아미노산 잔기의 길이, 또는 약 8 내지 약 450, 약 8 내지 약 400, 약 8 내지 약 350, 약 8 내지 약 300, 약 8 내지 약 250, 약 8 내지 약 200, 약 8 내지 약 150, 약 8 내지 약 100, 약 8 내지 약 50, 또는 약 8 내지 약 30개의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다.

[0153] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 이상의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 네오항원성 펩티드는 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500개 이상의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 최대로 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 이하의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 최대로 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500개 이하의 아미노산 잔기의 길이일 수 있다.

[0154] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 150, 적어도 200, 적어도 250, 적어도 300, 적어도 350, 적어도 400, 적어도 450, 또는 적어도 500개의 아미노산의 총 길이를 갖는다.

[0155] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 8 이하, 9 이하, 10 이하, 11 이하, 12 이하, 13 이하, 14 이하, 15 이하, 16 이하, 17 이하, 18 이하, 19 이하, 20 이하, 21 이하, 22 이하, 23 이하, 24 이하, 25 이하, 26 이하, 27 이하, 28 이하, 29 이하, 30 이하, 40 이하, 50 이하, 60 이하, 70 이하, 80 이하, 90 이하, 100 이하, 150 이하, 200 이하, 250 이하, 300 이하, 350 이하, 400 이하, 450 이하, 또는 500개 이하의 아미노산의 총 길이를 갖는다.

[0156] 일부 실시형태에서, 네오항원성 펩티드는 약 0.5 내지 약 12, 약 2 내지 약 10, 또는 약 4 내지 약 8의 pI 값을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 네오항원성 펩티드는 적어도 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 이상의 pI 값을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 네오항원성 펩티드는 최대한 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 이하의 pI 값을 가질 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 약 1 pM 내지 약 1 mM, 약 100 pM 내지 약 500 μM, 약 500 pM 내지 약 10 μM, 약 1 nM 내지 약 1 μM, 또는 약 10 nM 내지 약 1 μM의 HLA 결합 친화성을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900 μM 이상의 HLA 결합 친화성을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 최대로 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900 μM의 HLA 결합 친화성을 가질 수 있다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원 또는 네오항원성 펩티드는 담체 예컨대 당분야에 충분히 공지된 것, 예를 들어 티로글르로불린, 알부민 예컨대 인간 혈청 알부민, 파상풍 톡소이드, 폴리아미노산 잔기 예컨대 폴리 L-리신, 폴리 L-글루탐산, 인플루엔자 바이러스 단백질, B형 간염 바이러스 코어 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0159] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원 또는 네오항원성 펩티드는 말단-NH_2 아실화에 의해서, 예를 들어 알카노일 (C_1-C_{20}) 또는 티오글리콜릴 아세틸화, 말단-카르복실 아미드화, 예를 들어, 암모니아, 메틸아민 등에 의해서 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들 변형은 지지체 또는 다른 분자에 연결을 위한 부위를 제공할 수 있다.

[0160] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원 또는 네오항원성 펩티드는 변형 예컨대 제한없이 글리코실화, 측쇄 산화, 바이오틴화, 인산화, 표면 활성 물질, 예를 들어 지질의 첨가를 함유할 수 있거나, 또는 화학적으로 변형, 예를 들어, 아세틸화 등이 될 수 있다. 게다가, 펩티드의 결합은 펩티드 결합이외의 것, 예를 들어 공유 결합, 에스테르 또는 에테르 결합, 디술피드 결합, 수소 결합, 이온 결합 등일 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원 또는 네오항원성 펩티드는 최종 펩티드의 물리적 성질 (예를 들어, 안정성 또는 가용성)을 변형시키기 위한 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 네오항원성 펩티드는 시스테인 (C)의 α-아미노 부티르산 ("B")으로의 치환에 의해 변형될 수 있다. 이의 화학적 속성 덕분에, 시스테인은 디술피드 브릿지를 형성하고 결합 능력을 감소시키도록 펩티드를 구조적으로 충분히 변경시키는 경향을 갖는다. C의 α-아미노 부티르산으로의 치환은 이러한 문제를 경감시킬뿐만 아니라, 일정 상황에서 실제로 결합 및 교차결합 능력을 개선시킨다. 시스테인의 α-아미노 부티르산으로의 치환은 항원 또는 네오항원성 펩티드의 임의 잔기에서, 예를 들어 펩티드 내 에피토프 또는 유사체의 앵커 또는 비-앵커 위치에서, 또는 펩티드의 다른 위치에서 일어날 수 있다.

[0162] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원 펩티드 또는 네오항원성 펩티드는 아미노산 모방체 또는 비천연 아미노산 잔기, 예를 들어, D- 또는 L-나프틸알라닌; D- 또는 L-페닐글리신; D- 또는 L-2-티에네일알라닌; D- 또는 L- 1, 2, 3, 또는 4-피레네일알라닌; D- 또는 L-3 티에네일알라닌; D- 또는 L-(2-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(3-피리디닐)-알라닌; D- 또는 L-(2-피라지닐)-알라닌; D- 또는 L-(4-이소프로필)-페닐글리신; D-(트리플루오로메틸)-페닐글리신; D-(트리플루오로-메틸)-페닐알라닌; D-ρ-플루오로페닐알라닌; D- 또는 L-ρ-바이페닐-페닐알라닌; D- 또는 L-ρ-메톡시바이페닐페닐알라닌; D- 또는 L-2-인돌(알킬)알라닌; 및 D- 또는 L-알킬알라닌을 포함할 수 있고, 여기서 알킬 기는 치환 또는 미치환된 메틸, 에틸, 프로필, 헥실, 부틸, 펜틸, 이소프로필, 이소-부틸, sec-이소틸, 이소-펜틸, 또는 비산성 아미노산 잔기일 수 있다. 비-천연 아미노산의 방향족 고리는 예를 들어, 티아졸릴, 티오페닐, 피라졸릴, 벤지미다졸릴, 나프틸, 퓨라닐, 피롤릴, 및 피리딜 방향족 고리를 포함한다. 다양한 아미노산 모방체 또는 비천연 아미노산 잔기를 갖는 변형된 펩티드는 특히 유용한데, 그들이 생체내에서 증가된 안정성을 나타내는 경향이 있기 때문이다. 이러한 펩티드는 또한 개선된 저장 수명 또는 제조 성질을 보유할 수 있다.

[0163] 일부 실시형태에서, 펩티드는 면역 세포와 접촉하여 세포를 활성화시키고 그들을 항원 반응성이게 만든다.

[0164] 일부 실시형태에서, 펩티드는 생체외에서 면역 세포에 접촉된다.

[0165] 일부 실시형태에서, 펩티드는 살아있는 시스템, 예를 들어 인간에서 면역 세포에 접촉된다.

[0166] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 항원 제시 세포이다.

[0167] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다.

[0168] 본 개시는 면역원성 항원에 특이적인 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0169] 본 개시는 또한 APC로 자극된 항원 특이적 T 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항원 펩티드는 APC에 로딩되고, 펩티드 로딩된 APC는 이후에 항원 특이적 T 세포를 생성시키도록 T 세포를 자극하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 항원은 네오항원이다. 일부 실시형태에서, 펩티드 로딩에 사용되는 APC는 수지상 세포이다.

[0170] 일부 실시형태에서, 펩티드 서열은 대상체의 비-암 세포에 존재하지 않는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 대상체의 암 세포의 발현된 유전자 또는 유전자에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 펩티드 서열은 적어도 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 600; 700; 800; 900; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 4,000; 5,000; 7,500; 또는 10,000개 이상의 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다.

[0171] 일부 실시형태에서, 펩티드 서열은 클래스 I HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합하고 8-12 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 펩티드 서열은 클래스 II HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합하고 16-25 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 펩티드 서열은 다수의 항원 펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 항원 펩티드 서열은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개의 항원 펩티드 서열을 포함한다.

[0172] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항원은 네오항원이다. 후보 면역원성 네오항원 서열은 당분야에 공지된 임의의 적합한 방법으로 확인할 수 있다. 본 개시의 방법은 예를 들어, 질환에 대한 백신을 생성시키거나 또는 대상체의 질환에 특이적인 요법을 생성시키는데 유용할 수 있다. 후보 면역원성 네오항원은 이전에 확인된 네오항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 후보 면역원성 네오항원은 이전에 확인되지 않았을 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물에서 사용을 위한 후보 면역원성 네오항원은 대상체에 특이적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물에서 사용을 위한 후보 네오항원은 다수의 대상체에 특이적일 수 있다.

[0173] 동물 및 인간 둘 모두에서, 돌연변이된 에피토프는 면역 반응을 유도하거나 또는 T 세포를 활성화시키는데 잠재적으로 유효할 수 있다. 일 실시형태에서, 대상체 내 감염원, 예컨대 바이러스의 잠재적 면역원성 에피토프를 결정할 수 있다. 일 실시형태에서, 질환, 예컨대 암을 갖는 대상체의 잠재적 면역원성 돌연변이된 에피토프가 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 그들이 생성된 조직 유형의 세포 및 종양에서 발현되는 분화 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 다른 분화된 조직에서 발현되지 않은 암/배선 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 돌연변이된 항원일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 후보 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드는 유전자 절편의 종양 특이적 전좌를 통해서 생성된 융합 단백질의 미스센스 점 돌연변이 또는 항원 또는 네오항원을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 과발현된 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 종양에서 발견될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원은 그의 발현이 분화된 정상 조직의 세포에서 엄격하게 조절되는 단백질을 포함할 수 있다.

[0174] 잠재적 면역원성 돌연변이된 에피토프는 차세대 서열분석 기술을 사용하여 암 환자로부터의 종양 조직 및 건강한 조직의 게놈 또는 엑솜 서열분석을 통해 결정될 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 네오항원으로서 작용하는 능력 및 그들의 돌연변이 빈도를 기반으로 선택된 유전자는 차세대 서열분석 기술을 사용해 서열분석될 수 있다. 일 실시형태에서, 서열분석 데이터는 대상체의 HLA 분자에 결합할 수 있는 잠재적 면역원성 돌연변이된 펩티드를 확인하기 위해 분석될 수 있다. 일 실시형태에서, 데이터는 컴퓨터를 사용해 분석될 수 있다. 다른 실시형태에서 서열 데이터는 항원 또는 네오항원성 펩티드의 존재에 대해 분석될 수 있다. 일 실시형태에서, 잠재적 면

역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드는 MHC 분자에 대한 그들 친화성으로 결정될 수 있다.

[0175] 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드는 직접 단백질 서열분석을 통해 결정될 수 있다. 예를 들어, 다차원 질량 분광법 기술 (예를 들어, 직렬 질량 분광법 (MS/MS))을 사용한 효소적 단백질 분해물의 단백질 서열분석을 사용하여 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드를 확인할 수 있다.

[0176] 미지 단백질의 신규 서열분석을 위한 고속-대량 방법을 사용하여 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드를 확인할 수 있다. 예를 들어, 미지 단백질의 신규 서열분석을 위한 고속-대량 방법, 예컨대 메타-샷건 단백질 서열분석을 사용하여 잠재적 면역원성 발현된 네오항원을 확인하기 위해 대상체의 종양의 단백질체를 분석할 수 있다.

[0177] 잠재적 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드는 항원-특이적 T 세포 반응을 확인하기 위해 MHC 멀티머를 사용해 확인할 수 있다. 예를 들어, 환자 샘플 중 항원-특이적 T 세포 반응의 고속-대량 분석은 MHC 사량체-기반 스크리닝 기술을 사용하여 수행할 수 있다. 사량체-기반 스크리닝 기술은 잠재적 면역원성 종양 특이적 항원의 초기 확인을 위해서, 또는 대안적으로 환자가 이미 노출된 잠재적 면역원성 항원이 무엇인지 평가하기 위한 2차 스크리닝 프로토콜로서 사용될 수 있어서, 본 명세서에 기술된 방법에서 사용을 위한 잠재적 면역원성 항원의 선택을 용이하게 한다.

[0178] 일부 실시형태에서, 특이적 네오항원은 면역요법을 위해 표적화된다. 일부 실시형태에서, 네오항원성 펩티드가 합성된다. 본 명세서에서 사용되는 네오항원성 펩티드는 각각의 펩티드가 HLA 항원에 특이적이도록 설계되고 높은 결합 친화성 및 특이성으로 HLA 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 펩티드는 본 발명자가 생성한 고성능 HLA 결합 예측 모델을 기반으로 설계되고, 예를 들어 하기 특허 출원/공개물에 기술되어 있다: WO2011143656, WO2017184590, 및 US 가출원 번호 제62/783,914호 및 제62/826,827호; 이들 전부는 참조로 본 명세서에 편입된다. NetMHCIIpan은 현행 예측 표준일 수 있지만, 정확한 것으로 간주되지 않을 수 있다. 3개 클래스 II 유전자좌 (DR, DP, 및 DQ) 중에서, 데이터는 오직 HLA-DR의 소정 공통 대립유전자에 대해 존재할 수 있다. 간략하게, 새롭게 생성된 예측 모델은 면역원성 항원 펩티드를 확인하는 것을 돕고 약물, 예컨대 개인화 의료 약물을 개발하고, 항원-특이적 T 세포의 단리 및 특징규명에 사용될 수 있으며, 여기서 기계-학습 HLA-펩티드 제시 예측 모델은 적어도 훈련 데이터를 기반으로 확인된 다수의 예측자 변수로서, 훈련 데이터는 세포에서 발현된 HLA 단백질에 의해 제시되고 질량 분광법으로 확인된 펩티드의 서열의 서열 정보를 포함하는 것인 변수; 아미노산 위치 정보를 포함하는 훈련 펩티드 서열 정보로서, 훈련 펩티드 서열 정보는 세포에서 발현된 HLA 단백질과 연관되는 것인 서열 정보; 입력으로서 수용된 아미노산 위치 정보 및 아미노산 위치 정보 및 예측자 변수를 기반으로 출력으로서 생성된 제시 가능성 간 관련성을 나타내는 함수를 포함한다. CD4+ T 세포 반응은 항-종양 활성을 가질 수 있다. 현존하는 예측 방법에서 높은 비율의 CD4+ T 세포 반응이 클래스 II 예측을 사용하지 않고 확인될 수 있다 (예를 들어, NeoVax 연구에서 60%의 SLP 에피토프 (NT-001에서 49%), 및 BioNTech 연구에서 48%의 mRNA 에피토프). 이들 에피토프가 전형적으로 (종양에 의해서 또는 포식 DC에 의해서) 천연적으로 제시되는지 여부는 분명하지 않을 수 있다. 그러므로, 높은 CD4+ T 반응 속도는 천연적으로 제시된 클래스 II 에피토프의 확인을 개선시켜서 치료적 효능으로 면역되는 것이 바람직할 수 있다. 유전자 발현, 효소적 절단, 및 경로/국재화 편향성의 역할은 강력하게 정량화될 수 없었다. 오토파지 (종양 세포에 의한 클래스 II 제시) 또는 식세포작용 (APC에 의한 종양 에피토프의 클래스 II 제시)이 보다 관련된 경로인지 여부는 불분명할 수 있지만, 대부분의 현존하는 MS 데이터는 오토파지로부터 유래된 것으로 간주될 수 있다. 현장 표준 및 제안된 접근법을 포함하여, 클래스 II 제시의 규칙을 학습하기 위한 상이한 데이터 생성 접근법이 존재할 수 있다. 현장 표준은 NetMHCIIpan 예측자를 기반으로 할 수 있는, 친화성 측정을 포함할 수 있어서, 낮은 처치량을 제공하고 방사능 시약을 요구하고, 처치 역할을 놓치게 된다. 새로운 접근법은 질량 분광법을 포함하고, 여기서 세포주/조직/종양으로부터의 데이터는 오토파지에 대한 프로세싱 규칙을 결정하는데 도움을 줄 수 있고 (많은 이러한 데이터가 이미 공개됨) 단일-대립유전자 MS는 대립유전자-특이적 결합 규칙의 결정을 할 수 있다 (다수-대립유전자 MS 데이터는 효율적인 학습을 위해 매우 복잡한 것으로 간주된다. 새롭게 생성된 예측 방법은 기계-학습 HLA-펩티드 제시 예측 모델을 훈련하는 단계를 포함하고, 훈련은 컴퓨터 프로세서를 사용하여 HLA-펩티드 제시 예측 모델로 HLA 클래스 II 대립유전자를 발현하는 세포로부터의 하나 이상의 HLA-펩티드 복합체로부터 단리된 HLA-펩티드의 아미노산 위치 정보 서열을 입력하는 단계를 포함하고; 기계-학습 HLA-펩티드 제시 예측 모델은 적어도 세포에서 발현되는 HLA 단백질에 의해 제시되는 질량 분광법으로 확인되는 펩티드의 서열의 서열 정보를 포함하는 훈련 데이터를 기반으로 확인된 다수의 예측 변수; 훈련 펩티드의 아미노산 위치 정보를 포함하는 훈련 펩티드 서열 정보로서, 훈련 펩티드 서열 정보는 세포에서 발현된 HLA 단백질과 연관되는 것인

서열 정보; 입력으로서 수용된 아미노산 위치 정보 및 아미노산 위치 정보 및 예측자 변수를 기반으로 출력으로서 생성된 제시 가능성 간 관련성을 나타내는 함수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제시 모델은 0.1%-10%의 리콜율에서 적어도 0.25의 양성 예측값을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제시 모델은 0.1%-10%의 리콜율에서 적어도 0.4의 양성 예측값을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제시 모델은 0.1%-10%의 리콜율에서 적어도 0.6의 양성 예측값을 갖는다. 일부 실시형태에서, 질량 분광법은 단일-대립유전자 질량 분광법이다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 오토파지를 통해 세포에서 발현된 HLA 단백질에 의해 제시된다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 식세포 작용을 통해 세포에서 발현된 HLA 단백질에 의해 제시된다. 일부 실시형태에서, 훈련 데이터의 품질은 다수의 품질 메트릭스를 사용해 증가된다. 일부 실시형태에서, 다수의 품질 메트릭스는 공통 오염 펩티드 제거, 고채점 피크 강도, 높은 점수, 및 높은 질량 정확도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 채점된 피크 강도는 적어도 50%이다. 일부 실시형태에서, 채점된 피크 강도는 적어도 70%이다. 일부 실시형태에서, 세포에서 발현된 HLA 단백질에 의해 제시된 펩티드는 세포에서 발현된 단일 면역침전 HLA 단백질에 의해 제시된 펩티드이다. 일부 실시형태에서, 다수의 예측자 변수는 펩티드-HLA 친화성 예측자 변수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 예측자 변수는 공급원 단백질 발현 수준 예측자 변수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 예측자 변수는 펩티드 절단가능성 예측자 변수를 포함한다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질에 의해 제시되는 펩티드는 역-데이터베이스 검색 전략을 사용한 펩티드 데이터베이스 검색을 통해 확인된 펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질은 HLA-DR, 및 HLA-DP 또는 HLA-DQ 단백질이다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질은 HLA-DR, 및 HLA-DP 또는 HLA-DQ 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 HLA-DR 단백질이다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질은 HLA-DPB1*01:01/HLA-DPA1*01:03, HLA-DPB1*02:01/HLA-DPA1*01:03, HLA-DPB1*03:01/HLA-DPA1*01:03, HLA-DPB1*04:01/HLA-DPA1*01:03, HLA-DPB1*04:02/HLA-DPA1*01:03, HLA-DPB1*06:01/HLA-DPA1*01:03,HLA-DQB1*02:01/HLA-DQA1*05:01,HLA-DQB1*02:02/HLA-DQA1*02:01, HLA-DQB1*06:02/HLA-DQA1*01:02,HLA-DQB1*06:04/HLA-DQA1*01:02, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*01:02, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*03:02, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*04:03, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:07, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*08:03, HLA-DRB1*08:04, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*10:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*11:02, HLA-DRB1*11:04, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB1*12:02, HLA-DRB1*13:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*13:03, HLA-DRB1*14:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02, HLA-DRB1*15:03, HLA-DRB1*16:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB3*03:01, HLA-DRB4*01:01, 및 HLA-DRB5*01:01로 이루어진 군으로부터 선택되는 HLA-DR 단백질이다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질에 의해 제시되는 펩티드는 펩티드 데이터베이스에서 HLA-펩티드의 MS/MS 스펙트럼을 하나 이상의 HLA-펩티드의 MS/MS 스펙트럼과 비교하여 확인된 펩티드를 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 돌연변이는 점 돌연변이, 스플라이스 부위 돌연변이, 프레임시프트 돌연변이, 리드-쓰루 돌연변이, 및 유전자 융합 돌연변이로 이루어진 군에서 선택된다.

[0180] 일부 실시형태에서, HLA 단백질에 의해 제시되는 펩티드는 15-40 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, HLA 단백질에 의해 제시되는 펩티드는 (a) 하나 이상의 HLA 복합체를 단일 HLA 클래스 II 대립유전자를 발현하는 세포주로부터 단리하는 단계; (b) 하나 이상의 HLA-펩티드를 하나 이상의 단리된 HLA 복합체로부터 단리하는 단계; (c) 하나 이상의 단리된 HLA-펩티드에 대한 MS/MS 스펙트럼을 수득하는 단계; 및 (d) 펩티드 데이터베이스로부터 하나 이상의 단리된 HLA-펩티드의 MS/MS 스펙트럼에 상응하는 펩티드 서열을 수득하는 단계에 의해 확인된 펩티드를 포함하고, 단계 (d)로부터 수득된 하나 이상의 서열은 하나 이상의 단리된 HLA-펩티드의 서열을 확인한다.

[0181] 다양한 항원 펩티드는 T 세포를 유도하거나 또는 확장시키는데 사용될 수 있다. 다양한 항원 펩티드는 항원 제시 세포 (APC)를 활성화시키는데 사용되어서, 이후에 T 세포를 항원 로딩된 APC와 접촉시켜 T 세포를 활성화시킨다.

[0182] 일부 실시형태에서, 펩티드는 (A) 점 돌연변이, (B) 스플라이스-부위 돌연변이, (C) 프레임시프트 돌연변이, (D) 리드-쓰루 돌연변이, (E) 유전자-융합 돌연변이, 및 이의 조합으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 점 돌연변이를 포함하고 상응하는 야생형 펩티드에 비해서 더 큰 친화성으로 대상체의 HLA 단백질에 결합한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 펩티드는 500 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM 또는 10 nM 미만의 IC_{50}으로 대상체의 HLA 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 500 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM 또는 10 nM 미만의 IC_{50} 또는 K_D로 대상체의 HLA 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 각각의 펩티드는 대상체

에 의해 발현되는 HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 유도 또는 확장된 항원 특이적 T 세포의 TCR은 500 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM 또는 10 nM 미만의 IC_{50} 또는 K_D로 펩티드-HLA 복합체에 결합한다. 일부 실시형태에서, TCR은 500 nM, 250 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM 또는 10 nM 미만의 IC_{50} 또는 K_D로 펩티드-HLA 복합체에 결합한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 각각은 대상체의 비-암 세포에 존재하지 않는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 각각은 대상체의 암 세포의 발현된 유전자 또는 유전자에 의해 코딩된다.

[0184] 일부 실시형태에서, 펩티드는 적어도 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 600; 700; 800; 900; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 4,000; 5,000; 7,500; 또는 10,000개 이상의 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 클래스 I HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합하고 8-12 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 클래스 II HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합하고 16-25 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 펩티드는 다수의 펩티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 펩티드는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개 이상의 항원 펩티드를 포함한다.

[0185] 일부 양태에서, 본 개시는 본 명세서에서 상기 간략하게 기술한 방법을 사용해 확인된 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 (예를 들어, 종양 특이적 돌연변이를 갖는 펩티드, 바이러스 펩티드, 또는 비암성 질환과 연관된 펩티드)를 제공한다.

[0186] 일부 실시형태에서, 광학 방법은 면역원성 항원을 선택 또는 확인하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 바코드화 프로브는 면역원성 항원을 선택 또는 확인하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 표적 특이적 영역 및 바코드화된 영역을 포함하는 바코드화 프로브는 면역원성 항원을 선택 또는 확인하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 표적 특이적 영역은 표적 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열과 혼성화하거나 또는 그와 적어도 약 90%, 95% 또는 100% 서열 상보성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0187] **활성화된, 항원-특이적 T 세포의 제조**

[0188] 본 명세서는 T 세포를 자극하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 항원 특이적 T 세포를 자극하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 방법은 T 세포를 유도 또는 활성화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 활성화된 T 세포를 확장시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 미경험 T 세포를 유도하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포를 확장시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포를 확장시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 방법은 기억 표현형을 갖는 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포를 확장시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료적 조성물은 항원 특이적 CD8+ T 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료적 조성물은 항원 특이적 기억 T 세포를 포함할 수 있다.

[0189] T 세포는 네오항원성 펩티드 또는 네오항원성 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물에 의해서 생체외에서 활성화될 수 있다.

[0190] T 세포는 항원 로딩된 항원 제시 세포를 포함하는 조성물에 의해 생체외에서 활성화될 수 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, APC 및/또는 T 세포는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 유래된다.

[0192] 일부 실시형태에서, APC 및/또는 T 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 생물학적 샘플로부터 유래된다.

[0193] 일부 실시형태에서, 대상체는 APC 및/또는 T 세포를 제조하기 위해 생물학적 샘플을 수득하기 이전에 FLT3L이 투여된다.

[0194] 일부 실시형태에서, APC 및/또는 T 세포는 백혈구성분채집술 샘플인 생물학적 샘플로부터 유래된다.

[0195] 일부 실시형태에서, 항원 제시 세포는 먼저 네오항원성 펩티드로 생체외에서 로딩되고 네오항원 활성화된 T 세포를 제조하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물은 APC, 예컨대 항원 펩티드가 사전-로딩된 APC에 의해 자극된 T 세포를 포함한다. 조성물은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 T 세포

를 포함하는 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있고, T 세포는 APC-자극된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 네오항원성 펩티드를 코딩하는 mRNA는 네오항원성 펩티드의 발현을 위해 APC에 도입된다. 이러한 APC는 T 세포를 자극 또는 활성화시키기 위해서 사용된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 적어도 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%의 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율을 포함한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 생물학적 샘플 중 총 세포 계측수 중 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%. 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 미만, 또는 10% 미만의 항원 활성화된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 생물학적 샘플 중 총 세포 계측수 중 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30% 미만의 항원 활성화된 T 세포를 포함한다.

[0197] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 항원 미경험 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 생물학적 샘플 중 총 세포 계측수 중 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과의 항원 미경험 세포를 포함한다.

[0198] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 생물학적 샘플 중 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 미만이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD4+ T 세포의 백분율은 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 생물학적 샘플 중 적어도 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%이다.

[0199] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 면역 세포 중 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 총 면역 세포 중 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD4+ T 세포의 백분율은 총 면역 세포 중 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 네오항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 백분율은 생물학적 샘플 중 최대로 약 0.5%이다.

[0200] *네오항원 로딩된 APC의 제조*

[0201] 일부 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 사이토카인, 성장 인자 또는 리간드, 예컨대 APC 또는 T 세포의 세포 표면 수용체에 결합하는 리간드와 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함한다. 이러한 사이토카인, 성장 인자, 및 리간드의 비제한적인 예는 GM-CSF, IL-4, IL-7, FLT3L, TNF-α, IL-1β, IL-15, PGE1, IL-6, IFN-α IFN-γ, R848, LPS, ss-rna40, 및 폴리I:C를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 APC 또는 APC 조제물과 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함한다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 사이토카인, 성장 인자 및/또는 리간드 자극된 APC 또는 사이토카인, 성장 인자 및/또는 리간드 자극된 APC 조제물과 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 사이토카인 자극된 APC 또는 사이토카인 자극된 APC 조제물과 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 성장 인자 자극된 APC 또는 성장 인자 자극된 APC 조제물과 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 리간드 자극된 APC 또는 리간드 자극된 APC 조제물과 인큐베이션된 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있다.

[0202] 일부 실시형태에서, APC는 자기유래 APC, 동종이계 APC, 또는 인공 APC이다.

[0203] 면역 세포는 세포 표면 분자를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 바람직하게 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 항체를 사용하여, 예를 들어, 생물학적 샘플로부터, 바람직하게 세포 표면 마커를 기반으로, 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 일부 세포는 그들이 음성적으로 선택된 세포 표면 분자를 발현하지 않는 하

나 이상의 세포 유형을 농축시키기 위해 음성적으로 선택된다.

[0204] 일부 실시형태에서, 항원 제시 세포 (APC)는 T 세포를 활성화시키기 위해 사용되는, 네오항원-로딩된 APC를 생성시키기 위해 네오항원성 펩티드의 존재 하에서 배양될 수 있는 전구체 세포 또는 APC로부터 선택하여 생물학적 샘플로부터 제조된다. 세포 세트를 선택 및/또는 농축시키기 위한 관련 세포 표면 마커의 일부는 하기에 기술된다.

[0205] CD1 (cluster of differentiation 1)은 다양한 인간 항원-제시 세포의 표면 상에서 발현되는 당단백질의 패밀리이다. 그들은 클래스 I MHC 분자와 관련되고, T 세포에 대한 지질 항원의 제시에 관여된다.

[0206] CD11b 또는 인테그린 알파 M (ITGAM)은 마크로파지-1 항원 (Mac-1) 또는 보체 수용체 3 (CR3)으로도 공지된, 이종이량체 인테그린 알파-M 베타-2 ($\alpha_M\beta_2$) 분자를 형성하는 하나의 단백질 서브유닛이다. ITGAM은 또한 CR3A, 및 분화 클러스터 분자 11b (CD11b)로서 알려져 있다. $\alpha_M\beta_2$의 제2 사슬은 CD18로서 공지된 공통 인테그린 β_2 서브유닛이고, 따라서 인테그린 $\alpha_M\beta_2$는 β_2 서브패밀리 (또는 백혈구) 인테그린에 속한다. $\alpha_M\beta_2$는 단핵구, 과립구, 마크로파지, 및 자연 살해 세포를 포함하는, 선천성 면역계에 관여하는 많은 백혈구의 표면 상에서 발현된다. 이것은 백혈구 부착 및 이동을 조절하여 염증을 매개하고 몇가지 면역 과정 예컨대 식세포작용, 세포-매개 세포독성, 화학주성 및 세포 활성화에 연루되었다. 이것은 불활성화된 보체 성분 3b (iC3b)에 결합하는 이의 능력 덕분에 보체계에 관여된다. 인테그린 $\alpha_M\beta_2$의 ITGAM (알파) 서브유닛은 세포의 부착 및 확산의 초래에 직접적으로 관여되지만 β2 (CD18) 서브유닛의 존재없이 세포 이동을 매개할 수 없다.

[0207] 인테그린, 알파 X (보체 성분 3 수용체 4 서브유닛) (ITGAX)으로도 알려진, CD11c는 CD11c를 코딩하는 유전자이다. CD11c는 인테그린 알파 X 사슬 단백질이다. 인테그린은 알파 사슬 및 베타 사슬로 구성된 이종이량체 통합 막 단백질이다. 이러한 단백질은 베타 2 사슬 (ITGB2)과 조합되어서 불활성화된-C3b (iC3b) 수용체 4 (CR4)로도 지칭되는 백혈구-특이적 인테그린을 형성한다. 알파 X 베타 2 복합체는 자극된 내피 세포에 호중구 및 단핵구의 부착, 및 보체 코팅된 입자의 식세포작용에서, 알파 M 베터 2 인테그린의 성질이 중복되는 듯하다. CD11c는 대부분의 인간 수지상 세포뿐만 아니라, 단핵구, 마크로파지, 호중구, 및 세포 활성화를 유도하고 호중구 호흡기 파열을 촉발하는데 도움이 되는 일부 B 세포 상에서 높은 수준으로 발견되는 I형 경막 단백질이고; 모발 세포 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 및 일부 B-세포 만성 림프구성 백혈병에서 발현된다.

[0208] CD14는 단핵구/마크로파지 상에서 우선적으로 발현되는 표면 항원이다. 이것은 박테리아 리포다당류에 대한 선천성 면역 반응을 매개하기 위해 다른 단백질과 협력한다. 선택적 스플라이싱은 동일한 단백질을 코딩하는 다수 전사물 변이체를 생성시킨다. CD14는 2개 형태로 존재하는데, 하나는 글리코실포스파티딜이노시톨 꼬리부에 의해 막에 앵커링되고 (mCD14), 나머지는 가용성 형태 (sCD14)이다. 가용성 CD14는 mCD14 (48 kDa)의 발산 이후에 나타나거나 또는 세포내 소포체로부터 직접적으로 분비된다 (56 kDa). CD14는 박테리아 리포다당류 (LPS)의 검출을 위해 (Toll-유사 수용체 TLR 4 및 MD-2와 함께) 공-수용체로서 작용한다. CD14는 리포다당류-결합 단백질 (LBP)의 존재 하에서만 LPS에 결합할 수 있다. LPS가 이의 주요 리간드로서 간주되지만, CD14는 또한 다른 병원체-연관 분자 패턴 예컨대 리포테이코산을 인식한다.

[0209] CD25는 자극 이후에 통상의 T 세포에 의해 발현되고, 인간 말초 혈액에서, 오직 $CD4^+CD25^{hi}$ T 세포만이 '억제인자'인 것으로 확인되었다.

[0210] 일부 실시형태에서, APC는 수지상 세포 (DC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, APC는 $CD14^+$ 단핵구로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, APC는 피부, 비장, 골수, 흉선, 림프절, 말초 혈액, 또는 제대혈로부터 수득될 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD14^+$ 단핵구는 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플 유래이다. 예를 들어, $CD14^+$ 단핵구는 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 또는 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD14^+$ 단핵구는 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자로 자극된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IL-15, IFN-γ, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD14^+$ 단핵구는 PBMC를 포함하는 제2 생물학적 샘플 유래이다.

[0211] 일부 실시형태에서, APC의 단리된 개체군은 농축될 수 있거나 또는 실질적으로 농축될 수 있다. 일부 실시형태

에서, APC의 단리된 개체군은 적어도 30%, 적어도 50%, 적어도 75%, 또는 적어도 90% 균질하다. 일부 실시형태에서, APC의 단리된 개체군은 적어도 60%, 적어도 75%, 또는 적어도 90% 균질하다. APC, 예컨대 APC는 단핵구성 수지상 전구체로부터의 배양에서 유래된 APC를 비롯하여 조직 예컨대, 예를 들어, 말초 혈액, 제대혈, 피부, 비장, 골수, 흉선, 및 림프절에 존재하는 내생적으로-유래된 APC를 포함할 수 있다.

[0212] APC 및 APC에 대해 실질적으로 농축된 세포 개체군은 본 발명에서 또한 제공하는 방법으로 단리될 수 있다. 방법은 일반적으로 APC 전구체를 포함하는 세포의 개체군을 수득하는 단계, 미성숙 또는 성숙 APC로 APC 전구체의 분화를 포함하고,분화된 미성숙 또는 성숙 APC의 개체군으로부터 APC의 단리를 포함할 수 있다.

[0213] APC 전구체 세포는 당분야에 공지된 방법으로 수득될 수 있다. APC 전구체는 예를 들어, 밀도 구배 분리, 형광 활성화된 세포 분류 (FACS), 면역학적 세포 분리 기술 예컨대 패닝, 보체 용해, 로세팅, 자성 세포 분리 기술, 나일론 울 분리, 및 이러한 방법의 조합을 통해서 단리될 수 있다. APC를 면역 선택하기 위한 방법은 예를 들어, APC 전구체와 연관된 세포 표면 마커에 대한 항체, 예컨대 기재에 커플링된 항-CD34 및/또는 항-CD14 항체를 사용하는 단계를 포함한다.

[0214] APC 전구체의 농축된 개체군을 또한 수득할 수 있다. 이러한 농축된 전구체 개체군을 수득하기 위한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, APC 전구체의 농축된 개체군은 기재에 부착되는 세포의 선택적 제거를 통해서 조직 공급원으로부터 단리될 수 있다. 조직 공급원 예컨대, 예를 들어, 골수 또는 말초 혈액을 사용하여, 부착성 단핵구는 비부착 APC 전구체에 대해 농축된 개체군을 수득하기 위해 상업적으로 처치된 플라스틱 기재 (예를 들어, 비드 또는 자성 비드)를 사용해 세포 조제물로부터 제거될 수 있다.

[0215] 단핵구 APC 전구체는 APC 전구체-부착 기재를 사용하여 조직 공급원으로부터 수득될 수도 있다. 예를 들어, 백혈구성분채집술에 의해 단리된 말초 혈액 백혈구는 높은 표면 면적 대 부피 비율을 갖는 단핵구성 APC 전구체-부착 기재와 접촉시키고, 부착성 단핵구성 APC 전구체를 분리시킨다. 추가 실시형태에서, 커플링된 기재는 높은 표면 대 부피 비율을 갖는 미립자 또는 섬유성 기재, 예컨대, 예를 들어, 미세비드, 미세담체 비드, 펠렛, 과립, 분말, 모세관, 미세융모막 등일 수 있다. 또한, 미립자 또는 섬유성 기재는 유리, 폴리스티렌, 플라스틱, 유리-코팅된 폴리스티렌 미세비드 등일 수 있다.

[0216] APC 전구체는 또한 분화 및/또는 확장을 위해서 시험관내에서 배양될 수 있다. APC 전구체의 분화/확장을 위한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 확장은 APC (예를 들어, 수지상 세포) 분화/증식을 유도하는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 전구체를 배양하여 획득될 수 있다. 전형적으로, 이들 사이토카인은 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF) 또는 과립구/마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)이다. 또한, 다른 작용제는 배양 중 비-APC 세포 유형의 증식 및/또는 성숙화를 억제하여서, APC 전구체의 개체군을 더 농축시키는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 이러한 작용제는 사이토카인 예컨대, 예를 들어, IL-13, IL-4, 또는 IL-15 등을 포함한다.

[0217] APC 전구체의 단리된 개체군을 배양 및 분화시켜서 미성숙 또는 성숙 APC를 수득한다. 적합한 조직 배양 배지는 예를 들어, 제한없이, AIM-V®, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 등을 포함한다. 조직 배양 배지는 APC 표현형을 향해서 전구체의 분화를 촉진하기 위해 전형적으로 아미노산, 비타민, 2가 양이온, 및 사이토카인이 보충된다. 전형적으로, 분화-촉진 사이토카인은 GM-CSF 및/또는 IL-4이다.

[0218] 또한, APC 표현형으로 확장, 분화, 및 성숙화 동안 APC 전구체의 배양물은 APC의 발생을 촉진하도록 혈장을 포함할 수 있다. 전형적인 혈장 농도는 약 5%이다. 또한, 예를 들어, APC 전구체가 기재에 부착되어 단리될 때, 혈장은 배양 초기에 $CD14^{+}$ 표현형을 촉진하기 위해 부착 단계 동안 배양 배지에 포함될 수 있다. 부착 동안 전형적인 혈장 농도는 약 1% 이상이다.

[0219] 단핵구성 APC 전구체는 임의의 적합한 시간 동안 배양될 수 있다. 일정 실시형태에서, 미성숙 APC로 전구체의 분화를 위해 적합한 배양 시간은 약 1일 내지 약 10일, 예를 들어, 약 4일 내지 약 7일일 수 있다. 전구체로부터 미성숙 APC의 분화는 당업자에게 공지된 방법, 예컨대 세포 표면 마커 (예를 들어, $CD11c^{+}$, $CD83^{low}$, $CD86^{-/low}$, $HLA\text{-}DR^{+}$)의 존재 또는 부재를 통해서 모니터링될 수 있다. 미성숙 APC는 또한 추가 분화 또는 항원 흡수, 프로세싱 및 제시를 위한 상태로 미성숙 APC를 유지시키도록 적절한 조직 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 미성숙 APC는 GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에서 유지될 수 있다.

[0220] 일부 실시형태에서, APC 전구체는 분화 이전에 단리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단리된 개체군은 APC 전구체에 대해 농축 또는 실질적으로 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, APC 전구체는 CD14 특이적 프로브로 단리된다. 예시적인 일 실시형태에서, CD14 발현 세포는 형광 분자 (예를 들어, FITC 또는 PE)에 직접적으로 접합된

CD14 특이적 프로브 또는 CD14에 특이적인 미표지 항체 및 제1 항원에 특이적인 표지된 제2 항체를 사용한 FACS를 통해 검출된다. $CD14^{+}$ 세포는 FACS 분류법을 통해서 $CD14^{low}$ 및 $CD14^{-}$ 세포로부터 분리될 수 있다. $CD14^{high}$ 양성에 대한 게이팅은 예를 들어, PBMC-유래 단핵구 상에서 CD14 염색에 대해 결정될 수 있다. 전형적으로, CD14 특이적 결합제는 예를 들어, 항-CD14 항체 (예를 들어, 단일클론 또는 이의 항원 결합 단편)이다. 본 발명에서 사용에 적합한 다수의 항-CD14 항체는 당업자에게 충분히 공지되어 있고 많은 것들은 상업적으로 구매할 수 있다. 미성숙 APC (CD14 음성)로의 분화는 단리 이후에 일어날 수 있다.

[0221] 다른 실시형태에서, CD14 특이적 프로브는 기재에 커플링되고 $CD14^{+}$ 세포는 친화성 선택으로 단리된다. $CD14^{+}$ 세포를 포함하는 세포의 개체군은 커플링된 기재에 노출되고 $CD14^{+}$ 세포는 특이적으로 부착되게 허용된다. 비-부착성 $CD14^{-}$ 세포를 이후 기재로부터 세척해 내고, 다음으로 부착 세포를 용리하여 APC 전구체가 실질적으로 농축된 단리된 세포 개체군을 수득한다. CD14 특이적 프로브는 예를 들어, 항-CD14 항체일 수 있다. 기재는 예를 들어 상업적으로 입수가능한 조직 배양 플레이트 또는 비드 (예를 들어, 유리 또는 자성 비드)일 수 있다. 표면 마커에 특이적인 기질-커플링된 항체를 사용한 세포 개체군의 친화성 단리를 위한 방법은 일반적으로 공지되어 있다.

[0222] 배양 동안, 미성숙 APC는 임의로 사전결정된 항원에 노출될 수 있다. 적합한 사전결정 항원은 T-세포 조절이 바람직한 임의 항원을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 미성숙 APC는 암 면역요법 및/또는 종양 성장 억제를 위한 전립선 특이적 막 항원 (PSMA)의 존재 하에서 배양된다. 다른 항원은 예를 들어, 박테리아 세포, 바이러스, 부분 정제 또는 정제된 박테리아 또는 바이러스 항원, 종양 세포, 종양 특이적 또는 종양 연관 항원 (예를 들어, 종양 세포 용해물, 종양 세포 막 조제물, 종양에서 단리된 항원, 융합 단백질, 리포솜 등), 그 표면에 항원을 발현하는 재조합 세포, 자가항원, 및 임의의 다른 항원을 포함할 수 있다. 임의의 항원은 또한 펩티드 또는 재조합적으로 생성된 단백질 또는 이의 일부로서 존재할 수 있다. 항원과 접촉 후, 세포는 항원-특이적 APC의 개체군을 확장시키기 위해서, 항원 흡수 및 프로세싱을 허용하기에 적합한 임의 시간 동안 배양될 수 있다.

[0223] 예를 들어, 일 실시형태에서, 미성숙 APC는 MHC 분자의 경우에 항원을 제시하는 성숙 APC로 미성숙 APC의 성숙화를 촉진하기 위해 항원 흡수 이후에 배양될 수 있다. APC 성숙화 방법은 공지되어 있다. 이러한 성숙화는 예를 들어, 기지의 성숙화 인자, 예컨대 사이토카인 (예를 들어, TNF-α, IL-1β, 또는 CD40 리간드), 박테리아 생성물 (예를 들어, LPS 또는 BCG) 등의 존재 하에서 배양을 통해 수행될 수 있다. 성숙 APC로 미성숙 APC의 성숙화는 당분야에 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어 세포 표면 마커의 존재 또는 부재를 측정하거나 (예를 들어, CD83, CD86, 및 MHC 분자의 상향조절) 또는 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 어레이를 사용한 성숙 APC 특이적 mRNA 또는 단백질의 발현에 대해 시험하여, 모니터링될 수 있다.

[0224] 임의로, 미성숙 APC는 세포 개체군을 확장시키고/시키거나 추가 분화 또는 항원 흡수를 위한 상태로 미성숙 APC를 유지시키기 위해 적절한 조직 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 미성숙 APC는 GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에서 유지 및/또는 확장될 수 있다. 또한, 미성숙 APC는 미성숙 APC 성숙화를 억제하기 위해서 항-염증성 분자 예컨대, 예를 들어, 항-염증성 사이토카인 (예를 들어, IL-10 및 TGF-β)의 존재 하에서 배양될 수 있다.

[0225] 다른 양태에서, APC의 단리된 개체군은 성숙 APC에 대해 농축된다. 성숙 APC의 단리된 개체군은 상기 기술된 바와 같은 성숙화 인자 (예를 들어, 박테리아 생성물, 및/또는 프로염증성 사이토카인)의 존재 하에서 미성숙 APC의 분화된 개체군을 배양하여서, 성숙화를 유도시켜 수득될 수 있다. 미성숙 APC는 CD14+ 세포를 제거하여 단리될 수 있다.

[0226] 본 발명의 또 다른 양태에 따라서, APC는 예를 들어 적합한 항원에 노출 전 또는 노출 이후에 저온저장하여 보존될 수 있다. 사용할 수 있는 저온저장제는 디메틸 술폭시드 (DMSO), 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 알부민, 덱스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리쓰리톨, D-리비톨, D-만니톨, D-솔비톨, i-이노시톨, D-락토스, 콜린 클로라이드, 아미노산, 메탄올, 아세트아미드, 글리세롤 모노아세테이트, 및 무기염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 제어된 느린 냉각 속도가 핵심적일 수 있다. 상이한 저온저장제 및 상이한 세포 유형은 전형적으로 상이한 최적 냉각 속도를 갖는다. 물이 얼음으로 변하는 융합기의 가열은 전형적으로 최소되어야 한다. 냉각 절차는 예를 들어 프로그램가능한 냉동 장치 또는 메탄올 수조 절차의 사용을 통해 수행될 수 있다. 프로그램가능한 냉동 장치는 최적 냉각 속도의 결정을 허용하고 표준 재현 냉각을 촉진한다. 프로그램가능한 제어 속도 냉각기 예컨대 Cryomed 또는 Planar는 바람직한 냉각 속도 곡선으로 냉동 용법의 조율을 허용한다.

[0227] 완전한 냉동 후에, APC는 장기간 저온 저장 용기로 신속하게 옮겨질 수 있다. 전형적인 실시형태에서, 샘플은 액체 질소 (-196℃) 또는 이의 증기 (-165℃)에서 극저온으로 저장될 수 있다. 특히 골수 또는 말초 혈액으로부터의 조혈 줄기 세포의 조작, 저온저장, 및 장기간 저장을 위한 고려사항 및 절차는 대체로 본 발명의 APC에 적용가능하다.

[0228] 냉동된 세포는 바람직하게 신속하게 해동되고 (예를 들어, 37-41℃로 유지된 수조에서) 해동 시에 즉시 차가워진다. 해동 시에 세포 군집화를 방지하기 위해서 세포를 처치하는 것이 바람직할 수 있다. 군집화를 방지하기 위해서, 제한없이, 냉동 전 및/또는 후 DNAse, 저분자량 덱스트란 및 시트레이트, 히드록시에틸 전분 등의 첨가를 포함한, 다양한 절차가 사용될 수 있다. 저온저장제가 인간에서 독성이 있으면, 해동된 APC의 치료적 사용 이전에 제거되어야 한다. 저온저장제를 제거하기 위한 한 방식은 미유의한 농도까지 희석에 의한다. 냉동 APC가 해동되고 회수되었으면, 그들은 비-냉동 APC에 대해 본 명세서에 기술된 바와 같은 T 세포를 활성화시키는데 사용될 수 있다.

[0229] 일 양태에서, T 세포 활성화를 위한 조성물은 하나 이상의 유형의 면역 세포가 고갈된 면역 세포의 개체군을 포함한다. 예를 들어, 조성물은 하나 이상의 단백질, 예컨대 하나 이상의 세포 표면 수용체를 발현하는 하나 이상의 유형의 면역 세포가 고갈된 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 포함하고, 개체군 중 CD14 및/또는 CD25 발현 면역 세포의 양은 개체군은 생물 학적 샘플 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양과 비례적으로 상이하다. 예를 들어, 조성물은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있고, 개체군 중 CD14 발현 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14를 발현하는 면역 세포의 양과 비례적으로 상이하다. 예를 들어, 조성물은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있고, 개체군 중 CD25 발현 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD25를 발현하는 면역 세포의 양과 비례적으로 상이하다. 예를 들어, 조성물은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있고, 개체군 중 CD14 및 CD25 발현 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14 및 CD25를 발현하는 면역 세포의 양과 비례적으로 상이하다. 예를 들어, 조성물은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 포함할 수 있고, 개체군 중 CD14 및 CD25를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14 및 CD25를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적다.

[0230] 본 명세서는 암 면역요법을 위한 세포 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 I. (a) fms-유사 티로신 키나제 3 리간드 (FLT3L)가 전처치된 대상체로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 수득하는 단계; (b) PBMC를 생체외에서 (i) 다수의 암 네오항원성 펩티드, 또는 다수의 암 네오항원성 펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로서, 각각의 암 네오항원성 펩티드 또는 이의 일부는 대상체에서 발현되는 HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합하는 것인, 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, (ii) 세포를 활성화시키기 위한 자극제, (iii) 생체외에서 세포 성장 및 유지를 촉진하여, 세포 개체군을 수득하는 작용제, 및 (iv) $CD11b^{low}$ 또는 CD11b 고갈된 항원 로딩된 APC를 수득하도록 세포 개체군으로부터 CD11b+ 세포를 감소 또는 고갈시키는 작용제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 항원 로딩된 항원 제시 세포 (APC)를 제조하는 단계; II. 단리된 T 세포를 $CD11b^{low}$ 또는 CD11b 고갈된 항원 로딩된 APC와 생체외에서 접촉시키는 단계; III. 암 면역요법을 위한 세포 조성물을 위한 항원 프라임된 T 세포를 제조하는 단계를 포함한다.

[0231] 본 명세서는 종양 항원-특이적 T 세포를 생체외에서 제조하기 위한 개선된 방법을 제공하고, 방법은 (a) 항원 제시 세포 (APC) 및 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜서, APC 및 T 세포의 제1 개체군을 포함하는 면역 세포의 CD14 및/또는 CD25 고갈된 개체군을 형성시키는 단계로서, 면역 세포의 개체군은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 유래된 것인 단계; (b) 단계 (a)로부터의 APC 및 T 세포의 제1 개체군을 제1 시간 기간 동안 (i) FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L), 및 (ii) (A) 암을 갖는 인간 대상체의 암 세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 (B) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 존재 하에서 인큐베이션시켜서, 자극된 T 세포를 포함하는 세포의 개체군을 형성하는 단계; (c) 단계 (b)로부터의 자극된 T 세포를 확장시켜서, 종양 항원-특이적 T 세포를 포함하는 세포의 확장된 개체군을 형성시키는 단계로서, 종양 항원-특이적 T 세포는 (i) 단계 (b) (ii)로부터의 적어도 하나의 종양 항원 에피토프 서열, 및, (ii) (b)(ii)의 인간 대상체의 암 세포,

또는 APC에 의해 발현되는 MHC 단백질을 포함하는 복합체에 특이적인 T 세포를 포함하는 것인 단계를 포함한다. 본 명세서는 단계 (c)로부터의 세포의 확장된 개체군을 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 단계 (c)로부터의 세포의 확장된 개체군은 $1x10^{8}$ 내지 $1x10^{11}$개의 총 세포를 포함한다.

[0232] 일부 실시형태에서, 대상체는 PBMC 또는 백혈구성분채집술의 단리 이전 적어도 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 1주에 FLT3L로 전처치된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 PBMC 또는 백혈구성분채집술의 단리 이전 적어도 약 1주, 2주, 3주, 4주, 또는 5주에 FLT3L로 전처치된다.

[0233] 일부 실시형태에서, 세포 개체군은 CD11c+ 세포에 대해 농축된다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 수지상 세포 (DC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 형질세포양 수지상 세포 (pDC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 CD1c+ DC를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 CD141+ DC를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 개체군은 마크로파지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 네오항원 활성화된 T 세포를 활성화 또는 농축시키기 위해 세포 개체군으로부터 CD19+ 세포를 감소 또는 고갈시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 네오항원 활성화된 T 세포를 활성화 또는 농축시키기 위해 세포 개체군으로부터 CD11b+ 및 CD19+ 세포 둘 모두를 감소 또는 고갈시키는 단계를 더 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 방법은 항원 활성화된 T 세포를 제조 및 농축시키기 위해 세포 개체군으로부터 CD14+ 세포를 감소 또는 고갈시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 항원 활성화된 T 세포를 제조 및 농축시키기 위해 세포 개체군으로부터 CD25+ 세포를 감소 또는 고갈시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 네오항원 활성화된 T 세포를 활성화 또는 농축시키기 위해 세포 개체군으로부터 CD19+, CD14+, CD25+ 또는 CD11b+ 세포 중 하나 이상을 감소 또는 고갈시키는 단계를 더 포함한다.

[0235] 일부 실시형태에서, 세포를 활성화시키기 위한 자극제는 FL3TL을 포함한다.

[0236] 일부 실시형태에서, 세포 성장 및 유지를 생체외에서 촉진하는 촉진제는 성장 인자, 사이토카인, 아미노산, 보충제 또는 이의 조합을 포함한다.

[0237] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC는 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 동안 T 세포를 자극할 수 있다.

[0238] 일부 실시형태에서, 다수의 암 네오항원성 펩티드의 각각은 8-30개의 아미노산 길이이다.

[0239] 일부 실시형태에서, 다수의 네오항원성 펩티드의 각각은 네오항원성 에피토프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 암 네오항원성 펩티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 네오항원성 펩티드를 포함하고, 다수의 네오항원성 펩티드의 각각은 이전 섹션에 기술된 바와 같은 네오항원성 펩티드 특징을 갖는다.

[0240] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 제조하는데 사용되는 네오항원성 펩티드는 적어도 20 아미노산, 또는 적어도 30 아미노산 또는 적어도 40 아미노산 또는 적어도 50개의 아미노산, 또는 이 사이의 임의 수의 아미노산을 포함하는 장형 펩티드이다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 제조하는데 사용되는 네오항원성 펩티드는 T 세포에 대한 제시의 증가된 속도를 위해서 네오항원성 펩티드의 내생성 프로세싱을 촉진하는 돌연변이의 양쪽 측면 상에 측접되는 아미노산을 포함한다.

[0241] 더 긴 면역원성 펩티드가 몇가지 방식으로 설계될 수 있다. 일부 실시형태에서, HLA-결합 펩티드가 예측되거나 또는 공지되어 있을 때, 더 긴 면역원성 펩티드는 (1) 각각의 상응하는 유전자 생성물의 N-말단 및 C-말단쪽으로 2-5 아미노산의 연장을 갖는 개별 결합 펩티드; 또는 (2) 서로에 대해 연장된 서열을 갖는 결합 펩티드의 일부 또는 전부의 콘카타머형으로 이루어질 수 있다. 다른 실시형태에서, 서열분석이 장형 (>10 잔기) 에피토프, 예를 들어 종양에 존재하는 네오에피토프 서열을 밝혀주는 경우 (예를 들어, 신규 펩티드 서열을 초래하는 프레임시프트, 리드-쓰루 또는 인트론 포함으로 인함), 더 긴 네오항원성 펩티드는 단일한 더 긴 펩티드로서 또는 몇개의 중복되는 더 긴 펩티드로서 신규한 종양-특이적 아미노산의 전체 스트레치로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 더 긴 펩티드의 사용은 환자에 의한 내생성 프로세싱을 허용하는 것으로 간주되고 보다 효과적인 항원 제시 및 T 세포 반응의 유도를 일으킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 펩티드가 중복되고 장형 네오항원성 펩티드 상에서 타일링된 경우에, 둘 이상의 펩티드가 사용될 수 있다.

[0242] 일부 실시형태에서, 다수의 네오항원성 펩티드의 각각은 동일한 네오항원성 에피토프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 네오항원성 펩티드는 하나 초과의 네오항원성 에피토프를 포함한다.

[0243] 일부 실시형태에서, 다수의 암 네오항원성 펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 DNA이다.

[0244] 일부 실시형태에서, 다수의 암 네오항원성 펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 포유동물 발현 벡터에 삽입된다.

[0245] 일부 실시형태에서, 다수의 암 네오항원성 펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 메신저 RNA이다.

[0246] 일부 실시형태에서, 본 발명은 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 RNA, 올리고리보뉴클레오티드, 및 폴리리보뉴클레오티드 분자를 제공한다.

[0247] 일부 실시형태에서, 본 발명은 RNA, 올리고리보뉴클레오티드, 및 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 제공한다.

[0248] 일부 실시형태에서, 본 발명은 유전자 요법 방법 및 이를 포함하는 유전자 전사 침묵화 방법을 제공한다.

[0249] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 단일 네오항원성 펩티드를 코딩한다.

[0250] 일부 실시형태에서, 하나의 폴리뉴클레오티드는 하나 초과의 네오항원성 펩티드를 코딩한다.

[0251] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 메신저 RNA이다. 일부 실시형태에서, 각각의 메신저 RNA는 직렬의 둘 이상의 네오항원성 펩티드에 대한 코딩 서열을 포함한다.

[0252] 일부 실시형태에서, 각각의 메신저 RNA는 직렬로 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이상의 네오항원성 펩티드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 전형적으로, mRNA는 5'-UTR, 단백질 코딩 영역, 및 3'-UTR을 포함한다. mRNA 오직 세포 및 시험관내에서 제한된 반감기를 보유한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 자가-증폭 mRNA이다. 본 발명의 상황에서, mRNA는 DNA 주형으로부터 시험관내 전사를 통해 생성될 수 있다. 시험관내 전사 방법론은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 상업적으로 입수가능한 다양한 시험관내 전사 키트가 존재한다.

[0253] RNA의 안정성 및 번역 효율을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, RNA는 RNA의 번역 효율을 증가시키고/시키거나 안정화 효과를 갖는 하나 이상의 변형을 통해서 안정화될 수 있고 이의 번역을 증가시킬 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 참조로 본 명세서에 편입되는 PCT/EP2006/009448에 기술된다. 본 발명에 따라 사용되는 RNA의 발현을 증가시키기 위해서, mRNA 안정성을 증가시키도록 GC-함량을 증가시키고 코돈 최적화를 수행하고, 따라서 세포에서 번역을 증강시키기 위해, 발현된 펩티드 또는 단백질의 서열 변경없이, 코딩 영역, 즉, 발현된 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 서열 내에서 변형될 수 있다.

[0254] 일부 실시형태에서, mRNA는 다수의 네오항원성 에피토프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 장형 폴리리보뉴클레오티드 서열은 NEO-ORF를 코딩하는 것, 예를 들어, NEO-ORF를 코딩하는, 돌연변이된 GATA3 서열이 사용될 수 있다. 일부에서, 네오항원성 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 유전자의 큰 부분, 또는 심지어 이의 전체 코딩 영역의 mRNA는 항원의 내생성 프로세싱 및 제시를 위해 면역 세포로 전달된다.

[0255] 일부 실시형태에서, 각각의 네오항원성 펩티드의 코딩 서열은 24-120개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0256] 일부 실시형태에서, mRNA는 50-10,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 100- 10,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 200-10,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 50-5,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 100-5,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 100-1,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 300-800개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 400-700개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 450-600개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 적어도 200개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 250개 뉴클레오티드 초과, 300개 뉴클레오티드 초과, 350개 뉴클레오티드 초과, 400개 뉴클레오티드 초과, 450개 뉴클레오티드 초과, 500개 뉴클레오티드 초과, 550개 뉴클레오티드 초과, 600개 뉴클레오티드 초과, 650개 뉴클레오티드 초과, 700개 뉴클레오티드 초과, 750개 뉴클레오티드 초과, 800개 뉴클레오티드 초과, 850개 뉴클레오티드 초과 길이, 900개 뉴클레오티드 초과 길이, 950개 뉴클레오티드 초과 길이, 1000개 뉴클레오티드 초과 길이, 2000개 뉴클레오티드 초과 길이, 3000개 뉴클레오티드 초과 길이, 4000개 뉴클레오티드 초과 길이 또는 5000개 뉴클레오티드 초과 길이이다.

[0257] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 네오항원성 펩티드를 코딩하는 mRNA는 변형되고, 변형은 5'-UTR과 관련된다. 일부 실시형태에서, 변형은 RNA에 5'-UTR 중 5'-캡 또는 5'-캡 유사체를 제공하는 것에 관한 것이다. 용어 "5'-캡"은 mRNA의 5'-말단 상에 존재하는 캡 구조를 의미하고 일반적으로 드문 5' 내지 5' 트리포스페이트 연결을 통해서 mRNA에 연결된 구아노신 뉴클레오티드로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 이러한 구아노신은 7-위치에서 메틸화된다. 용어 "통상의 5'-캡"은 천연 발생 RNA 5'-캡, 7-메틸구아노신 캡 (m G)을 의미한다. 본 발명의 상

황에서, 용어 "5'-캡"은 RNA 캡 구조를 닮고 생체내 및/또는 세포에서 그에 부착되면 RNA를 안정화시키고/시키거나 RNA의 번역을 증강시키는 능력을 보유하도록 변형되는 5'-캡 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 공-전사적으로 캡핑된다.

[0258] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 네오항원성 펩티드를 코딩하는 mRNA는 폴리A 테일을 포함하는 3'-UTR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 100-200 bp 길이이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 20개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 50개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 60개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 70개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 80개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 90개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 100개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 110개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 120개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 130개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 140개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 150개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 160개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 170개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 180개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 190개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 200개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 210개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 220개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 230개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 100개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 240개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 100개 뉴클레오티드 초과이다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 약 250개 뉴클레오티드이다.

[0259] 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 100-250개의 아데노신 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 120-130개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 120개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 121개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 122개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 123개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 124개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 125개의 아데닌 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리A 테일은 129개의 염기이다.

[0260] 일부 실시형태에서, 2개의 연속 네오항원성 펩티드의 코딩 서열은 스페이서 또는 링커에 의해 이격된다.

[0261] 일부 실시형태에서, 스페이서 또는 링커는 최대 5000 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 예시적인 스페이서 서열은 GGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGC이다. 다른 예시적인 스페이서 서열은 GGCGGCAGCCTGGGCGGCGGCGGCAGCGGC이다. 다른 예시적인 스페이서 서열은 GGCGTCGGCACC이다. 다른 예시적인 스페이서 서열은 CAGCTGGGCCTG이다. 다른 예시적인 스페이서는 리신, 예컨대 AAA 또는 AAG를 코딩하는 서열이다. 다른 예시적인 스페이서 서열은 CAACTGGGATTG이다.

[0262] 일부 실시형태에서, mRNA는 APC에 의한 항원 에피토프 프로세싱 및 제시를 증강시키도록 하나 이상의 추가 구조를 포함한다.

[0263] 일부 실시형태에서, 링커 또는 스페이서 영역은 절단 부위를 함유할 수 있다. 절단 부위는 에피토프 서열의 스트링을 포함하는 단백질 생성물의 제시를 위한 별개 에피토프 서열로의 절단을 보장한다. 바람직한 절단 부위는 서열 내 에피토프의 우연한 절단을 피하기 위해서 소정 에피토프에 인접하여 위치된다. 일부 실시형태에서, 에피토프의 스트링을 코딩하는 mRNA 상의 절단 영역 및 에피토프의 설계는 비-무작위적이다.

[0264] 일정 실시형태에서, 본 발명의 네오항원성 에피토프를 코딩하는 mRNA는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 투여하려는 mRNA는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드-포스페이트를 포함한다.

[0265] 일부 실시형태에서, T 세포는 인공 항원 제시 세포에 의한 네오항원성 펩티드로 활성화된다. 일부 실시형태에서, 인공 스캐폴드는 네오항원성 펩티드로 T 세포를 활성화시키는데 사용되고 인공 스캐폴드는 네오항원성 펩티드가 고친화성으로 결합할 수 있는 MHC 항원과 커플링된 네오항원성 펩티드가 로딩된다.

[0266] 일부 실시형태에서, 추가 구조는 MITD, SP1, 및 제10 피브로넥틴 도메인: 10FnIII의 군으로부터 선택되는 단백질로부터의 특이적 도메인을 코딩하는 것을 포함한다.

[0267] 일부 실시형태에서, 말초 혈액 또는 백혈구성분채집술로부터 유래된 세포는 항원 로딩된 APC를 제조하기 위해서 다수의 암 네오항원성 펩티드, 또는 다수의 암 네오항원성 펩티드를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드와

1회 또는 1회 초과로 접촉된다.

[0268] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 또는 하나 이상의 APC 조제물을 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자를 포함하는 제1 배지와 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0269] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 APC 조제물을 적어도 하나의 펩티드와 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0270] 일부 실시형태에서, 농축된 세포는 CD1c+ 세포를 더 포함한다.

[0271] 일부 실시형태에서, 세포 개체군은 CD11c+ 및 CD141+ 세포에 대해 농축된다.

[0272] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 포함하는 세포 개체군은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상의 CD11c+ 세포를 포함한다.

[0273] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 포함하는 세포 개체군은 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 20%, 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 이하의 CD11b+ 발현 세포를 포함한다.

[0274] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 포함하는 세포 개체군은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 초과의 CD11c+인 네오항원성 펩티드 발현 세포를 포함한다.

[0275] 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 APC를 포함하는 세포 개체군은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 초과의 CD11c+ CD1c+, 또는 CD141+ 세포인 네오항원성 펩티드 발현 세포를 포함한다.

[0276] 일부 실시형태에서, 네오항원 로딩된 APC는 성숙 APC를 포함한다.

[0277] 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 APC 및 적어도 하나의 PBMC 또는 적어도 T 세포를 포함하는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함한다

[0278] 일부 실시형태에서, 방법은 CD14 및/또는 CD25 및/또는 CD19를 발현하는 세포를 생물학적 샘플로부터 고갈시켜서, CD14 및/또는 CD25 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플을 수득하는 단계를 포함한다.

[0279] 일부 실시형태에서, 방법은 CD14 및/또는 CD25 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플을 FLT3L과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0280] 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 펩티드를 CD14 및/또는 CD25 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제1 성숙 APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계를 포함한다.

[0281] *네오항원 로딩된 APC를 사용한 네오항원 활성화된 T 세포의 제조*

[0282] 일부 실시형태에서, 상기 기술된 방법으로 제조된 네오항원 로딩된 APC (APC)는 T 세포오 인큐베이션되어서 항원 활성화된 T 세포가 수득된다. 방법은 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 생성시키는 단계를 포함하고, 여기서 항원은 네오항원이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 생성시키는 단계는 다수의 항원 특이적 T 세포를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0283] 일부 실시형태에서, T 세포는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득된다.

[0284] 일부 실시형태에서, T 세포는 APC가 유래되는 동일 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 APC가 유래되는 대상체와 상이한 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득된다.

[0285] 일부 실시형태에서, APC 및/또는 T 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 생물학적 샘플로부터 수득된다. 일부 실시형태에서, APC 및/또는 T 세포는 백혈구성분채집술 샘플인 생물학적 샘플로부터 유래된다.

[0286] 일부 실시형태에서, APC는 수지상 세포 (DC)를 포함한다.

[0287] 일부 실시형태에서, APC는 CD14+ 단핵구로부터 유래되거나, 또는 CD14 농축된 APC이거나, 또는 CD141 농축된 APC이다.

[0288] 일부 실시형태에서, CD14+ 단핵구는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)을 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 농축된다.

[0289] 일부 실시형태에서, APC는 PBMC이다. 일부 실시형태에서, PBMC는 새로 단리된 PBMC이다. 일부 실시형태에서, PBMC는 냉동 PBMC이다. 일부 실시형태에서, PBMC는 대상체 또는 환자로부터 단리된 자기유래 PBMC이다.

[0290] 일부 실시형태에서, PBMC는 항원이 로딩되고, 항원은 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 펩티드 및 폴리펩티드를 코딩하는, mRNA일 수 있다. PBMC (단핵구, DC 포식 세포)는 식세포 작용으로 항원을 흡수할 수 있고 그들을 프로세싱하여 T 세포 활성화를 위해 표면 상에 제시할 수 있다. PBMC 상에 로딩된 펩티드 또는 폴리펩티드는 면역원성을 증가시키도록 보강제가 보충될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 핵산 항원이 로딩된다. 핵산 항원은 하나 이상의 항원을 코딩하는 서열을 포함하는, mRNA의 형태일 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 항원 로딩은 예를 들어, RNA가 자기-보강제로서 작용할 수 있기 때문에, 보강제 보충을 요구하지 않는다.

[0291] 일부 실시형태에서, PBMC는 직접 단리되거나 또는 냉동 샘플로부터 해동되고, 하나 이상의 항원, 예컨대 네오항원, 또는 네오항원, 또는 하나 이상의 항원을 코딩하는 하나 이상의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물과 인큐베이션된다. 일부 실시형태에서, PBMC 샘플은 하나 이상의 항원 또는 하나 이상의 항원을 코딩하는 핵산에 대해 PBMC를 노출시키기 전에, 분화를 위해 더 배양되지 않거나, 또는 PBMC 내 하나 이상의 세포 성분의 추가 성숙화 (예를 들어, 항원 제시 세포의 성숙화, 또는 수지상 세포로 단핵구의 분화)를 겪지 않는다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 유형은 하나 이상의 항원 또는 하나 이상의 항원을 코딩하는 핵산에 세포를 노출시키거나 또는 인큐베이션시키기 전에 새로 단리된 PBMC 세포 개체군 또는 새로 해동된 PBMC 개체군으로부터 고갈 또는 제거된다. 일부 실시형태에서, CD14+ 세포는 PBMC로부터 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD25+ 세포는 PBMC로부터 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 세포는 PBMC로부터 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD14+ 및 CD25+ 세포는 하나 이상의 항원 또는 하나 이상의 항원을 코딩하는 하나 이상의 핵산과 인큐베이션 전에, PBMC로부터 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+, 및/또는 CD14+ 및/또는 CD25+ 세포는 PBMC로부터 고갈된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공되는 방법은 인간 대상체의 말초 혈액 중 미성숙 DC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 미성숙 수지상 세포 (DC)를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 방법은 인간 대상체의 말초 혈액 중 성숙 DC의 백분율과 대략 동일한 백분율의 성숙 DC를 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공하는 방법은 인간 대상체의 말초 혈액 중 미성숙 DC 대 성숙 DC의 비율과 대략 동일한 미성숙 DC 대 성숙 DC의 비율을 함유하는 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 성숙 DC로 미성숙 DC의 성숙화 단계를 겪지 않은 인간 대상체로부터의 PBMC 샘플로부터 CD14+ 세포 및/또는 CD25+ 세포를 고갈시켜 종양 항원-특이적 T 세포를 제조하는 단계를 포함한다.

[0292] 일부 실시형태에서, CD14+ 단핵구는 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자로 자극된다.

[0293] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IL-15, IFN-γ, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0294] 일부 실시형태에서, CD14+ 단핵구는 PBMC를 포함하는 제2 생물학적 샘플 유래이다.

[0295] 일부 실시형태에서, 제2 생물학적 샘플은 동일 대상체 유래의 것이다.

[0296] 부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함한다.

[0297] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원-특이적 T 세포는 IL-7, IL-15, 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1 (IDO) 억제제, 항-PD-1 항체, IL-12, 또는 이의 조합을 포함하는 배지에서 자극된다.

[0298] 일부 실시형태에서, IDO 억제제는 에파카도스타트, 나복시모드, 1-메틸트립토판, 또는 이의 조합이다.

[0299] 일부 실시형태에서, 대상체는 APC 및/또는 T 세포를 제조하기 위해 생물학적 샘플을 수득하는 단계 이전에 FLT3L이 투여된다.

[0300] 일부 실시형태에서, T 세포는 본 개시의 이전 섹션에 기술된 바와 같이 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득된다.

[0301] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 새로 수득되거나 또는 냉동 샘플이다.

[0302] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IL-15, IFN-γ, IFN-α, IL-15, R848, LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, 또는 이의 임의 조합을 포함하는, 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자의 존재 하에 있다.

[0303] 일부 실시형태에서, 방법은 IL-7, IL-15, 또는 이의 조합으로 T 세포를 자극시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 IDO 억제제, PD-1 항체 또는 IL-12의 존재 하에서, IL-7, IL-15, 또는 이의 조합으로 T 세포를 자극시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 자극된 T 세포는 하나 이상의 종양 항원 에피토프 서열 또는 하나 이상의 종양 항원 에피토프 서열이 로딩된 APC, 또는 하나 이상의 종양 항원 에피토프 서열을 코딩하는 핵산 서열 (예컨대 mRNA 서열)이 로딩 (예를 들어, 발현)된 APC의 존재 하에서, 생체외 적합한 T 세포 성장 조건 하에, 확장되고, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IL-15, IFN-γ, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, 또는 이의 조합, FLT3L을 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 항원 특이적 T 세포를 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0304] 일부 실시형태에서, 방법은 네오항원 활성화된 T 세포를 생성시키기 위해 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자를 포함하는 배지의 존재 하에서 T 세포와 이전 섹션에서 기술된 바와 같이 제조된 APC를 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0305] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 7일 초과 동안 T 세포에 대한 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션된 T 세포는 APC 조제물, 사이토카인 및 성장 인자의 존재 하에 시험관내에서 7일 초과 동안 확장된 자극된 T 세포이다.

[0306] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 초과 동안 T 세포에 대한 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0307] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 시간 기간 중 제1 시간 기간은 약 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9일이다.

[0308] 일부 실시형태에서, 별도 시간 기간의 총 시간 기간은 28일 미만이다. 일부 실시형태에서, 별도 시간 기간의 총 시간 기간은 20-27일이다. 일부 실시형태에서, 별도 시간 기간의 총 시간 기간은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 또는 39일이다.

[0309] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 T 세포와 7일 초과 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 T 세포와 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 초과 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 T 세포와 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 또는 12-20일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 T 세포와 약 10-15일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0310] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제2 APC 조제물을 T 세포에 대해 5-9일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제2 APC 조제물을 T 세포에 대해 5, 6, 7, 8, 또는 9일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 제3 시간 기간 이후 및 제4 시간 기간의 시작 이전에 제2 배지의 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자를 제거하는 단계를 더 포함한다.

[0311] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제3 APC 조제물을 T 세포에 대해 5-9일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제3 APC 조제물을 T 세포에 대해 5, 6, 7, 8, 또는 9일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0312] 일부 실시형태에서, 방법은 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 T 세포와 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22일 동안 인큐베이션시키는 단계, APC 조제물의 제2 APC 조제물을 T 세포와 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22일 동안 인큐베이션시키는 단계, 및 APC 조제물의 제3 APC 조제물을 T 세포와 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22일 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0313] 일부 실시형태에서, 방법은 생체외에서 수행된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 사이토카인을 함유하는 배지에서 배양된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인의 예는 IL-7을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이토카인의 예는 IL-15를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이토카인의 예는 IL-7 및 IL-15를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포는 IL-7, 및/또는 IL-15를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양물 또는 배지 중 사이토카인은 적어도 0.05 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.8 ng/mL, 1

ng/mL, 2 ng/mL, 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 12 ng/mL, 15 ng/mL, 18 ng/mL, 또는 20 ng/mL의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양물 또는 배지 중 IL-7은 적어도 0.05 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.8 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 12 ng/mL, 15 ng/mL, 18 ng/mL, 또는 20 ng/mL의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양물 또는 배지 중 IL-15는 적어도 0.05 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.8 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 12 ng/mL, 15 ng/mL, 18 ng/mL, 또는 20 ng/mL의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시형태에서, T 세포는 FLT3L를 더 함유하는 배지에서 배양된다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양물 또는 배지 중 FLT3L은 적어도 1 ng/mL, 2 ng/mL, 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 12 ng/mL, 15 ng/mL, 18 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 90 ng/mL, 100 ng/mL, 또는 200 ng/mL의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시형태에서, T 세포는 제1 시간 기간 동안 FLT3L을 함유하는 배지에서 인큐베이션, 유도, 또는 자극된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 제2 시간 기간 동안 추가로 첨가된 FLT3L을 함유하는 배지에서 인큐베이션, 유도, 또는 자극된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 제3 시간 기간 동안 추가로 첨가된 FLT3L을 함유하는 배지에서 인큐베이션, 유도, 또는 자극된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 제4, 제5, 또는 제6 시간 기간 동안 추가로 첨가된 FLT3L을 함유하는 배지에서 인큐베이션, 유도, 또는 자극되고, 각 시간 기간에 FLT3L은 새로 첨가된다.

[0314] 일부 실시형태에서, T 세포는 네오항원, 예를 들어, APC에 의해 제시된 네오항원의 존재 하에서 배양되고, 배지는 고 칼슘 $[K]^+$ 함량을 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포는 적어도 APC 또는 T 세포와 인큐베이션 되는 동안의 시간 기간 동안 배지 중 고 $[K]^+$ 함량의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시형태에서, 배지 중 $[K]^+$ 함량은 적어도 APC 또는 T 세포와 인큐베이션되는 동안의 시간 기간 동안 변경된다. 일부 실시형태에서, 배지 중 함량은 T 세포의 생체외 배양 기간 동안 일정하게 유지된다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 5 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 6 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 7 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 8 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 9 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 10 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 11 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 12 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 13 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 14 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 15 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 16 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 17 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 18 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 19 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 20 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 22 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 25 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 30 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 35 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 ≥ 40 mM이다. 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 약 40 mM이다.

[0315] 일부 실시형태에서, T 세포 배양 배지 중 $[K]^+$ 함량은 적어도 네오항원과 T 세포의 인큐베이션 동안의 기간 동안 약 40 mM이다. 일부 실시형태에서, 네오항원은 네오항원 로딩된 APC에 의해 제시될 수 있다. 일부 실시형태에서, $[K]^+$ 존재 하에서 T 세포는 T 이펙터 기능, CD8+ 세포독성, 사이토카인 생성, 및 기억 표현형에 대해 검사된다. 일부 실시형태에서, 고 $[K]^+$ 의 존재 하에서 성장되는 T 세포는 이펙터 T 세포 표현형을 발현한다. 일부 실시형태에서, 고 $[K]^+$ 의 존재 하에서 성장되는 T 세포는 기억 세포 마커를 발현한다. 일부 실시형태에서, 고 $[K]^+$ 의 존재 하에서 성장되는 T 세포는 T 세포 고갈 마커를 발현하지 않는다.

[0316] 일부 실시형태에서, 자극된 T 세포는 네오항원성 펩티드-MHC 복합체를 포함하는 APC로 자극된 활성화된 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군이다. 일부 실시형태에서, 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 펩티드-MHC 복합체를 포함하는 APC와 인큐베이션하여서, 자극된 면역 세포 샘플을 수득하는 단계; 자극된 면역 세포 샘플의 적어도 하나의 면역 세포의 하나 이상의 세포 마커의 발현을 결정하는 단계; 및 펩티드-MHC 복합체에 대한 자극된 면역 세포 샘플의 적어도 하나의 면역 세포의 결합을 결정하는 단계를 포함할 수 있고, 소정 세포 표면 마커 또는 다른 결정자 마커, 예컨대 세포내 인자, 또는 방출제, 예컨대 사이토카인 등의 발현의 결정, 및 네오항원-MHC 복합체에 대한 결합이 결정은 동시에 수행된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 마커는 TNF-α, IFN-ɣ, LAMP-1, 4-1BB, IL-2, IL-17A, 그랜자임 B, PD-1, CD25, CD69, TIM3, LAG3, CTLA-4, CD62L, CD45RA, CD45RO, FoxP3, 또는 이의 임의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 마커는 사이토카인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 마커는 탈과립화 마커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 마커는 세포-표면 마커를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 마커는 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 펩티드-MHC 복합체에 대한 자극된 면역 세포 샘플의 적어도 하나의 면역 세포의 결합을 결정하는 단계는 펩티드 및 펩티드-MHC 복합체의 MHC를 포함하는 MCH 사량체에 대한 자극된 면역 세포 샘플의 적어도 하나의 면역 세포의 결합을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, MHC는 클래스 I MHC 또는 클래스 II MHC이다. 일부 실시형태에서, 펩티드-MHC 복합체는 하나 이상의 표지를 포함한다.

[0317] 일부 실시형태에서, T 세포의 활성화는 활성화된 T 세포에 의한 사이토카인의 방출을 검출하여 검증된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 TNF-α, IFN-ɣ, 또는 IL-2 중 하나 이상이다. 일부 실시형태에서, T 세포의 활성화는 이의 특이적 항원 결합 및 사이토카인 방출에 의해 검증된다. 일부 실시형태에서, T 세포의 활성화는 시험관내에서 종양 세포를 사멸시키는 이의 능력으로 검증된다. 활성화된 T 세포의 샘플은 T 세포의 활성화 상태를 검증하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포로부터의 샘플은 유세포측정을 통해서 세포 조성 및 활성화 상태를 결정하기 위해 T 세포 배양물로부터 추출된다.

[0318] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 5%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 7%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 10%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 12%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 15%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 20%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 25%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 30%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 40%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 50%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 60%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 80%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 약 90%이다.

[0319] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 5%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 7%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 10%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 12%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 15%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 20%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 25%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 30%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 40%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 50%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 약 60%이다. 일부 실시형태에서,

조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 약 70%이다.

[0320] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD4+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다.

[0321] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다.

[0322] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다.

[0323] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD4+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 최대로 약 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 또는 0.5%이다.

[0324] 일부 실시형태에서, 항원은 네오항원, 종양 연관 항원, 과발현된 항원, 바이러스 항원, 부조직적합성 항원 또는 이의 조합이다.

[0325] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 수즌 적어도 약 1x10^6, 2x10^6, 5x10^6, 1x10^7, 2x10^7, 5x10^7, 1x10^8, 2x10^8, 또는 5x10^8의 항원 특이적 CD8+ T 세포이다.

[0326] 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD4+ T 세포의 수는 적어도 약 1x10^6, 2x10^6, 5x10^6, 1x10^7, 2x10^7, 5x10^7, 1x10^8, 2x10^8, 또는 5x10^8의 항원 특이적 CD4+ T 세포이다.

[0327] **약학 조성물**

[0328] 본 명세서는 면역 세포의 개체군을 포함하는 조성물 (예를 들어, 약학 조성물)을 제공한다. 조성물은 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함할 수 있다. 조성물은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함할 수 있다.

[0329] 약학 조성물은 약학적으로 사용할 수 있는 조제물로 활성제의 프로세싱을 촉진하는 보조제 및 부형제를 포함하는 하나 이상의 생리적으로 허용되는 담체를 사용해 제제화될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 의존할 수 있다. 임의의 충분히 공지된 기술, 담체, 및 부형제는 당분야에서 적합하고 이해되는 바와 같이 사용될 수 있다.

[0330] 일부 경우에, 약학 조성물은 세포 기반 치료제, 예를 들어, T 세포 치료제로서 제제화된다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 펩티드-기반 요법, 핵산-기반 요법, 항체 기반 요법, 및/또는 세포 기반 요법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 펩티드-기반 치료제, 또는 핵산이 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 기반 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 펩티드-기반 치료제, 또는 핵산이 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 기반 치료제를 포함하고, 펩티드-기반 치료제, 또는 핵산 기반 치료제는 세포에 포함되고, 여기서 세포는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 항체 기반 치료제로서 포함한다. 조성물은 둘 이상의 면역원성 항원 또는 네오항원성 펩티드에 특이적인 T 세포를 포함할 수 있다.

[0331] 일 양태에서, 본 명세서는 (a) 생물학적 샘플로부터의 T 세포를 포함하는 면역 세포의 개체군으로서, T 세포는 APC-자극된 T 세포이고 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하고, APC는 FLT3L-자극된 APC인 것인 면역 세포의 개체군; 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0332] 일 양태에서, 본 명세서는 (a) 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군, 및 (b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공하고; 개체군 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양과 비례적으로 상이하다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 적어도 하나의 APC-자극된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체군

중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 적다. 일부 실시형태에서, 개체군 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양은 생물학적 샘플 중 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 면역 세포의 양에 비해 비례적으로 많다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 적어도 하나의 CD4+ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 적어도 하나의 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 적어도 하나의 CD4 농축된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 적어도 하나의 CD8 농축된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 기억 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 기억 CD4+ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 기억 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다. 일부 실시형태에서, 조성물 중 적어도 하나의 항원 특이적 CD8+ T 세포의 백분율은 총 CD4+ T 세포, 총 CD8+ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다.

[0333] 약학 조성물은 활성 성분이외에도, 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 충분히 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 무독성이어야 하고 활성 성분의 효능을 발해해서는 안된다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 속성은 투여 경로에 의존적일 것이다.

[0334] 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 적용되는 용량 및 농도에서 수령체에게 무독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레솔시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당류 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 반대-이온 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제 예컨대 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0335] 허용되는 담체는 투여되는 환자에게 생리적으로 허용되며 그와 투여되는 화합물의 치료적 성질을 유지한다. 허용되는 담체 및 그들 제제는 일반적으로, 예를 들어, [Remington' 약학 Sciences (18th ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990)]에 기술되어 있다. 담체의 일례는 생리적 염수이다. 약학적으로 허용되는 담체는 대상 화합물을 신체의 한 장기 또는 일부분의 투여 부위로부터 신체의 다른 장기 또는 일부분으로 운반 또는 수송하는데 관여하거나, 또는 시험관내 어세이 시스템에서 포함되는, 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액상 또는 고형 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화재이다. 허용되는 담체는 그것이 투여되는 대상체에게 유해하지 않고 제제의 다른 성분과 상용성이다. 허용되는 담체는 네오항원의 특이적 활성을 변경시켜서는 안된다.

[0336] 일 양태에서, 본 명세서는 약학적 투여와 상용성인, 용매 (수성 또는 비수 성), 용액, 에멀션, 분산 매질, 코팅제, 등장화 및 흡수 촉진 또는 지연제를 포함하는 약학적으로 허용되거나 또는 생리적으로 허용되는 조성물이다. 그러므로, 약학 조성물 또는 약학 제제는 대상체에서 약학적 용도에 적합한 조성물을 의미한다. 조성물은 특정 투여 경로 (즉, 전신 또는 국부)와 상용성이도록 제제화될 수 있다. 따라서, 조성물은 다양한 경로를 통한 투여에 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함한다.

[0337] 일부 실시형태에서, 조성물은 조성물 중 면역 세포의 안정성을 개선시키기 위해 허용되는 첨가제를 더 포함할 수 있다. 허용되는 첨가제는 면역 세포의 특이적 활성을 변경시키지 않을 수 있다. 허용되는 첨가제의 예는 당류 예컨대 만니톨, 솔비톨, 글루코스, 자일리톨, 트레할로스, 솔보스, 수크로스, 갈락토스, 덱스트란, 덱스트로스, 프룩토스, 락토스 및 이의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 허용되는 첨가제는 허용되는 담체 및/또는 부형제 예컨대 덱스트로스와 조합될 수 있다. 대안적으로, 허용되는 첨가제의 예는 폡티드의 안정성을 증가시키고 용액의 겔화를 감소시키도록 계면활성제 예컨대 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80을 포함하지

만, 이에 제한되지 않는다. 계면활성제은 용액의 0.01% 내지 5%의 양으로 조성물에 첨가될 수 있다. 이러한 허용되는 첨가제의 첨가는 저장 중인 조성물의 안정성 및 반감기를 증가시킨다.

[0338] 약학 조성물은 예를 들어, 주사를 통해 투여될 수 있다. 주사용 조성물은 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산물 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해서, 적합한 담체는 생리적 염수, 정균수, 또는 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 포함한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는, 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 유동성은 예를 들어, 코팅제 예컨대 레시틴의 사용에 의해서, 분산물의 경우 필요한 입자 크기의 유지를 통해서, 그리고 계면활성제의 사용을 통해서 유지될 수 있다. 항박테리아제 및 항진균제는 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티머로살을 포함한다. 등장화제, 예를 들어, 당류, 폴리알콜 예컨대 만니톨, 솔비톨, 및 염화나트륨이 조성물에 포함될 수 있다. 최종 용액은 그 자체로 사용을 위해 포장될 수 있거나, 또는 동결건조될 수 있고, 동결건조된 조제물은 이후에 투여 전에 멸균 용액과 배합될 수 있다. 정맥내 주사, 또는 고통 부위의 주사 경우에, 활성 성분은 발열원-무함유이고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수성 용액의 형태일 것이다. 당업자는 예를 들어, 등장성 비히클 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산화 링거 주사액 사용해 적합한 용액을 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 필요에 따라 포함될 수 있다. 멸균 주사용 용액은 필요하면, 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매 중에 필요량으로 활성 성분을 유입시킨 후에, 여과 멸균하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것 중에서 다른 필요 성분을 함유하는 멸균 비히클로 활성 성분을 유입시켜 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 사전에 멸균-여과된 이의 용액으로부터의 임의의 추가적인 바람직한 성분이 더해진 활성 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 동결 건조일 수 있다.

[0339] 조성물은 통상적으로 정맥내로, 예컨대 예를 들어, 단위 용량의 주사를 통해서, 투여될 수 있다. 주사의 경우에, 활성 성분은 실질적으로 발열원-무함유이고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수성 용액의 형태일 수 있다. 예를 들어, 등장성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산화 링거 주사액을 사용해 적합한 용액을 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 필요하면, 포함될 수 있다. 추가로, 조성물은 에어로졸화를 통해 투여될 수 있다.

[0340] 조성물이 본 명세서에서 제공되는 임의의 방법 또는 약물에서 사용이 고려되는 경우에, 조성물이 인간 환자에게 투여되었을 때 안전하지 않은 알레르기 반응 또는 염증 반응을 초래하지 않도록 발열원이 실질적으로 없는 것으로 간주된다. 발열원에 대한 조성물의 검사 및 발열원이 실질적으로 없는 조성물의 제조는 당업자가 충분히 이해하고 있으며 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하 수행될 수 있다.

[0341] 허용되는 담체는 안정화제로서 작용하거나, 흡수를 증가 또는 지연시키거나, 제거를 증가시키거나 또는 지연시키는 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 화합물은 예를 들어, 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 또는 덱스트란; 저분자량 단백질;펩티드의 제거 또는 가수분해를 감소시키는 조성물; 또는 부형제 또는 다른 안정화제 및/또는 완충제를 포함한다. 흡수 지연제는 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함한다. 세제는 또한 리포솜 담체를 포함하는, 약학 조성물의 흡수를 증가 또는 감소시키거나 또는 안정화시키는데 사용될 수 있다. 분해로부터 보호하기 위해서 화합물은 이것을 산성 및 효소적 가수분해에 내성이게 만들도록 조성물과 복합체화될 수 있거나, 또는 화합물은 적절하게 내성인 담체 예컨대 리포솜과 복합체화될 수 있다. 분해로부터 화합물을 보호하는 수단은 당분야에 공지되어 있다 (예를 들어, Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764; Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119 135; 및 미국 특허 제5,391,377호).

[0342] 조성물은 용량 제제와 상용성인 방식으로, 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 투여되는 분량은 치료하려는 대상체, 활성 성분을 이용하는 대상체의 면역계의 능력, 및 바람직한 결합 능력의 정도에 의존적이다. 투여하는데 요구되는 활성 성분의 정밀한 양은 임상의의 판단에 의존하며 각 개인에 대해 고유하다. 초기 투여 및 부스터샷에 적합한 용법도 역시 가변적이지만, 초기 투여 이후에 후속 주사 또는 다른 투여까지 하나 이상의 시간 간격에서 반복 용량이 후속된다. 대안적으로 혈중 농도를 유지하는데 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

[0343] 일부 실시형태에서, 본 발명은 면역원성 조성물, 예를 들어, 네오항원-특이적 반응 (예를 들어, 체액성 또는 세포-매개 면역 반응)을 상승시킬 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 종양 특이적 항원 또는 네오항원에 상응하는 본 명세서에 기술된 네오항원 치료제 (예를 들어, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, TCR, CAR, TCR 또는 CAR을 함유하는 세포, 폴리펩티드를 함유하는 수지상 세포, 폴리뉴클레오티드를 함유하는 수지상 세포, 항체 등)를 포함한다.

[0344] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 특이적 세포독성 T 세포 반응, 특이적 헬퍼 T 세포 반응, 또는 B 세포 반응을 상승시킬 수 있다.

[0345] 일부 실시형태에서, 항원 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)로서 제공될 수 있다. 다른 실시형태에서, 이러한 항원 제시 세포는 환자에서 사용을 위해 T 세포를 자극시키는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다. 관련 실시형태에서, 수지상 세포는 네오항원성 펩티드 또는 핵산으로 펄스된 자기유래 수지상 세포이다. 네오항원성 펩티드는 적절한 T 세포 반응을 상승시키는 임의의 적합한 펩티드일 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CTL이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 HTL이다. 따라서, 본 개시의 일 실시형태는 본 명세서에 기술된 하나 이상의 네오항원 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 펄스 또는 로딩된 적어도 하나의 항원 제시 세포 (예를 들어, 수지상 세포)를 함유하는 면역원성 조성물이다. 일부 실시형태에서, 이러한 APC는 자기유래 (예를 들어, 자기유래 수지상 세포)이다. 대안적으로, 환자로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 네오항원성 펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 생체외에서 로딩될 수 있다. 관련 실시형태에서, 이러한 APC 또는 PBMC는 환자에게 다시 주사된다. 폴리뉴클레오티드는 수지상 세포를 형질도입시킬 수 있어서, 네오항원성 펩티드의 제시 및 면역력의 유도를 일으킬 수 있는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 항원 제시 세포 (APC) (예를 들어, 수지상 세포) 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 T 세포 (예를 들어, 자기유래 T 세포)를 자극하는데 사용된다. 관련 실시형태에서, T 세포는 CTL이다. 다른 관련 실시형태에서, T 세포는 HTL이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 이후에 이러한 T 세포는 환자에게 주사된다.

[0346] 일부 실시형태에서, CTL이 환자에게 주사된다. 일부 실시형태에서, HTL은 환자에게 주사된다. 일부 실시형태에서, CTL 및 HTL 둘 모두가 환자에게 주사된다. 각각의 치료제의 투여는 임의 순서로 순차적으로 또는 동시에 수행될 수 있다.

[0347] 일부 실시형태에서, 치료적 처치를 위해 본 명세서에 기술된 약학 조성물 (예를 들어, 면역원성 조성물)은 비경구, 국소, 비강, 경구 또는 국부 투여를 위해 제제화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 약학 조성물은 비경구로, 예를 들어, 정맥내, 피하, 피내, 또는 근육내로 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 종양내로 투여될 수 있다. 조성물은 종양에 대한 국부 면역 반응을 유도하기 위해 수술적 절제 부위에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서는 네오항원성 펩티드의 용액을 포함하는 비경구 투여용 조성물을 기술하고 면역원성 조성물은 허용되는 담체, 예를 들어, 수성 담체에 용해 또는 현탁된다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 물, 완충수, 0.9% 염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 통상의, 충분히 공지된 멸균 기술을 통해 멸균될 수 있거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 최종 수성 용액은 그 자체로 사용을 위해 포장될 수 있거나, 또는 동결건조될 수 있고, 동결건조 조제물은 투여 전에 멸균 용액과 배합된다. 조성물은 생리적 조건과 비슷하기 위해 요구되는 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조절 및 완충제, 등장성 조절제, 습윤제 등, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼슘, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 등을 함유할 수 있다.

[0348] 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 보강제의 능력은 전형적으로 면역-매개 반응의 유의한 증가, 또는 질환 증상의 감소를 통해 명확해진다. 예를 들어, 체액성 면역력의 증가는 항원에 대해 상승된 항체의 역가의 유의한 증가를 통해 명확해지고, T 세포 활성의 증가는 증가된 세포 증식, 또는 세포의 세포독성, 또는 사이토카인 분비로 명확해질 수 있다. 보강제는 또한 예를 들어, 주로 체액성 또는 T 헬퍼 2 반응을 주로 세포, 또는 T 헬퍼 1 반응으로 변화시켜서, 면역 반응을 변경시킬 수 있다.

[0349] 적합한 보강제는 당분야에 공지되어 있고 (참조: WO 2015/095811), 폴리(I:C), 폴리-ICLC, STING 효현제, 1018 ISS, 알루미늄 염, 암플리박스, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴 리피드 A, 몬타니드 IMS 1312, 몬타니드 ISA 206, 몬타니드 ISA 50V, 몬타니드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel® 벡터 시스템, PLG 미세입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로솜 및 다른 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF trap, R848, β-글루칸, Pam3Cys, Pam3CSK4, 사포닌에서 유래되는 Aquila의 QS21 스티뮤론 (Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA), 마이코박테리아 추출물 및 합성 박테리아 세포벽 모방체, 및 다른 사유 보강제 예컨대 Ribi's Detox. Quil 또는 Superfos를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 수지상 세포에 특이적인 면역학적 보강제 (예를 들어, MF59) 및 그들 조제물이 기술되어 있다 (Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11) (Mosca et al. Frontiers in Bioscience, 2007; 12:4050-

4060) (Gamvrellis et al. Immunol & Cell Biol. 2004; 82: 506-516). 또한, 사이토카인이 사용될 수 있다. 몇 가지 사이토카인은 림프양 조직으로 수지상 세포 이동에 영향 (예를 들어, TNF-α), T-림프구에 대한 효율적인 항원-제시 세포로 수지상 세포의 성숙화의 가속 (예를 들어, GM-CSF, PGE1, PGE2, IL-1, IL-1β, IL-4, IL-6 및 CD40L) (그 전문이 참조로 본 명세서에 편입되는 미국 특허 제5,849,589호) 및 면역보강제 (예를 들어, IL-12) (Gabrilovich D I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418)로서 작용과 직접적으로 연관있었다.

[0350] CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 또한 치료적 상황에서 보강제의 효과를 증강시킨다고 보고되었다. 이론에 국한하지 않지만, CpG 올리고뉴클레오티드는 Toll-유사 수용체 (TLR), 주로 TLR9를 통해 선천성 (비-획득성) 면역계를 활성화시켜 작용한다. CpG 촉발된 TLR9 활성화는 예방적 및 치료적 면역원성 약학 조성물 중에 펩티드 또는 단백질 항원, 생 또는 사멸 바이러스, 수지상 세포 면역원성 약학 조성물, 자기유래 세포 면역원성 약학 조성물 및 다당류 접합체를 포함한, 광범위하게 다양한 항원에 대한 항원-특이적 체액성 및 세포 반응을 증강시킨다. 중요하게, 수지상 세포 성숙화 및 분화를 증강시켜서, $CD4^+$ T 세포 도움의 부재 하에서도, TH1 세포의 증강된 활성화 및 강력한 세포독성 T-림프구 (CTL) 생성을 일으킨다. TLR9 자극에 의해 유도된 TH1 편향성은 정상적으로 TH2 편향성을 촉진하는 보강제 예컨대 명반 또는 불완전 프로인트 보강제 (IFA)의 존재하에서도 유지된다. CpG 올리고뉴클레오티드는 다른 보강제와 제제화 또는 공-투여되거나 또는 항원이 상대적으로 약할 때 강력한 반응을 유도하는데 특히 유용한, 제제 예컨대 미세입자, 나노입자, 지질 에멀션 또는 유사한 제제 중에 있을 때 보다 큰 보강제 활성을 보인다. 그들은 또한 면역 반응을 가속화시킬 수 있고 일부 실험에서 CpG 없는 전체-용량 면역원성 약학 조성물과 비슷한 항체 반응을 얻게 항원 용량을 감소시킬 수 있었다 (Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, June 2006, 471-484). 미국 특허 제6,406,705호는 항원-특이적 면역 반응을 유도시키도록 CpG 올리고뉴클레오티드, 비-핵산 보강제 및 항원의 조합된 사용을 기술한다. 상업적으로 입수 가능한 CpG TLR9 길항제는 본 명세서에 기술된 약학 조성물의 성분인, Mologen (Berlin, DE)의 dSLIM (double Stem Loop Immunomodulator)이다. 다른 TLR 결합 분자 예컨대 RNA 결합 TLR7, TLR8 및/또는 TLR9가 또한 사용될 수 있다.

[0351] 유용한 보강제의 다른 예는 화학적으로 변형된 CpG (예를 들어, CpR, Idera), 폴리(I 및/또는 폴리 C)(예를 들어, 폴리 I:CI2U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA, TLR8의 경우 ssRNA40을 비롯하여, 치료적으로 및/또는 보강제로서 작용할 수 있는, 면역활성 소형 분자 및 항체 예컨대 시클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙, 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타달라필, 바르데나필, 소라페닙, XL-999, CP-547632, 파조파닙, ZD2171, AZD2171, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 및 SC58175를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 상황에서 유용한 보강제 및 첨가제의 양 및 농도는 과도한 실험없이 당업자가 쉽게 결정할 수 있다. 추가 보강제는 콜로니-자극 인자, 예컨대 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF, 사르그라모스팀)를 포함한다.

[0352] 일부 실시형태에서, 본 개시에 따른 면역원성 조성물은 하나 초과의 상이한 보강제를 포함할 수 있다. 더 나아가서, 본 발명은 임의의 상기 또는 이의 조합을 포함하는 임의의 보강제 물질을 포함하는 약학 조성물을 포괄한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 네오항원 치료제 (예를 들어, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, TCR, CAR, TCR 또는 CAR을 함유하는 세포, 폴리펩티드를 함유하는 수지상 세포, 폴리뉴클레오티드를 함유하는 수지상 세포, 항체 등)를 포함하고 보강제는 임의의 적절한 순서로 별도로 투여될 수 있다.

[0353] 지질화는 몇가지 상이한 유형, 예컨대 N-미리스토일화, 팔미토일화, GPI-앵커 첨가, 프레닐화, 및 몇몇 추가 유형의 변형으로 분류될 수 있다. N-미리스토일화는 글리신 잔기에 미리스테이트, C14 포화산의 공유 부착이다. 팔미토일화는 시스테인 잔기에 장쇄 지방산 (C16)의 티오에스테르 연결이다. GPI-앵커 첨가는 아미드화 결합을 통한 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI) 연결이다. 프레닐화는 시스테인 잔기에 이소프레노이드 지질 (예를 들어, 파르네실 (C-15), 제라닐제라닐 (C-20))의 티오에테르 연결이다. 변형의 추가 유형은 시스테인의 황 원자를 통한 S-디아실글리세롤의 부착, 세린 또는 트레오닌 잔기를 통한 O-옥타노일 접합, 시스테인 장기에 S-알카에올 접합, 및 콜레스테롤 부착을 포함할 수 있다.

[0354] 지질화 펩티드를 생성시키기 위한 지방산은 C2 내지 C30 포화, 단일불포화, 또는 다중불포화 지방 아실 기를 포함할 수 있다. 예시적인 지방산은 팔미토일, 미리스토일, 스테아로일 및 데카노일 기를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 보강제 성질을 갖는 지질 모이어티가 관심 폴리펩티드에 부착되어서 외인성 보강제의 부재 하에서 면역원성을 유발 또는 증강시킨다. 지질화 펩티드 또는 지질펩티드는 자가-보강제 지질펩티드라고도 할 수 있다. 상기 및 본 명세서의 다른 곳에 기술된 임의의 지방산은 관심 폴리펩티드의 면역원성을 유발 또는 증강시킬 수 있다. 면역원성을 유발 또는 증강시킬 수 있는 지방산은 팔미토일, 미리스토일, 스테아로일, 라우로일, 옥타노일,

및 데카노일 기를 포함할 수 있다.

[0355] 폴리펩티드 예컨대 나형 펩티드 또는 지질화 펩티드가 리포솜에 도입될 수 있다. 때때로, 지질화 펩티드는 리포솜에 도입될 수 있다. 예를 들어, 지질화 펩티드의 지질 부분은 리포솜의 지질 이중층으로 자발적으로 통합될 수 있다. 따라서, 지질펩티드는 리포솜의 "표면" 상에 제시될 수 있다. 제제에 도입에 적합한 예시적인 리포솜은 다층막 소포체 (MLV), 올리고층막 소포체 (OLV), 단층막 소포체 (UV), 소형 단층막 소포체 (SUV), 중간-크기 단층막 소포체 (MUV), 대형 단층막 소포체 (LUV), 거대 단층막 소포체 (GUV), 다포성 소포체 (MVV), 역상 증발 방법 (REV)으로 만들어진 단일 또는 올리고층막 소포체, 역상 증발 방법으로 만든 다층막 소포체 (MLV-REV), 안정한 다층막 소포체 (SPLV), 냉동 및 해동 MLV (FATMLV), 압출 방법으로 제조된 소포체 (VET), 프렌치 프레스로 제조된 소포체 (FPV), 융합으로 제조된 소포체 (FUV), 탈수-재수화 소포체 (DRV), 및 버블솜 (BSV)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0356] 제조 방법에 따라서, 리포솜은 단층막 또는 다층막일 수 있고, 약 0.02 μM 내지 약 10 μm 초과 범위의 직경을 가져서 크기가 다양할 수 있다. 리포솜은 많은 유형의 세포를 흡수할 수 있고, 그 이후에 도입된 작용제 (예를 들어, 본 명세서에 기술된 펩티드)를 방출할 수 있다. 일부 경우에, 리포솜은 표적 세포와 융합되어서, 리포솜의 내용물이 표적 세포로 비워진다. 리포솜은 식세포작용하는 세포에 의해 세포내이입될 수 있다. 세포내이입은 리포솜 지질의 리소솜내 분해 및 캡슐화제의 방출이 후속될 수 있다.

[0357] 본 명세서에서 제공되는 리포솜은 또한 담체 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 담체 지질은 인지질이다. 리포솜을 형성할 수 있는 담체 지질은 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 포스파티딜콜린 (PC; 레시틴), 포스파티드산 (PA), 포스파티딜글리세롤 (PG), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜세린 (PS)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 적합한 인지질은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 디팔미토일포스파티디글리세롤 (DPPG), 디스테아로일포스파티디글리세롤 (DSPG), 디미리스토일포스파티딜글리세롤 (DMPG), 디팔미토일포스파티드산 (DPPA); 디미리스토일포스파티드산 (DMPA), 디스테아로일포스파티드산 (DSPA), 디팔미토일포스파티딜세린 (DPPS), 디미리스토일포스파티딜세린 (DMPS), 디스테아로일포스파티딜세린 (DSPS), 디팔미토일포스파티디에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일포스파티딜에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DSPE) 등, 또는 이의 조합을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 리포솜은 리포솜 형성을 조절하는 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤)을 더 포함한다. 담체 지질은 임의의 공지된 비-포스페이트 극성 지질일 수 있다.

[0358] 약학 조성물은 충분히 공지된 기술을 사용해 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 생분해성 미세구가 또한 본 발명의 약학 조성물을 위한 담체로서 적용될 수 있다.

[0359] 약학 조성물은 리포솜 또는 미세구 (또는 미세입자)로 투여될 수 있다. 환자에 투여를 위한 리포솜 및 미세구의 제조 방법은 당업자에게 충분히 공지되어 있다. 본질적으로, 물질을 수성 용액에 용해시키고, 적절한 인지질 및 지질을 필요하다면 계면활성제와 함께 첨가하고, 재료를 필요하면, 투석 또는 초음파처치한다.

[0360] 중합체 또는 단백질로 형성된 미세구는 당업자에게 충분히 공지되어 있고, 위장관을 통해서 직접적으로 혈류로 통과하도록 재단될 수 있다. 대안적으로, 화합물이 도입될 수 있고, 미세구, 또는 미세구의 복합체는, 수일 내지 수개월 범위의 시간 기간 동안 지연 방출을 위해 이식된다.

[0361] 세포-기반 면역원성 약학 조성물은 대상체에게 또한 투여될 수 있다. 예를 들어, 항원 제시 세포 (APC) 기반 면역원성 약학 조성물은 당분야에서 적합하고 이해되는 바와 같은 임의의 충분히 공지된 기술, 담체, 및 부형제를 사용해 제제화될 수 있다. APC는 단핵구, 단핵구-유래 세포, 마크로파지, 및 수지상 세포를 포함한다. 때때로, APC 기반 면역원성 약학 조성물은 수지상 세포-기반 면역원성 약학 조성물일 수 있다.

[0362] 수지상 세포-기반 면역원성 약학 조성물은 당분야에 충분히 공지된 임의 방법으로 제조될 수 있다. 일부 경우에, 수지상 세포-기반 면역원성 약학 조성물은 생체외 또는 생체내 방법을 통해 제조될 수 있다. 생체외 방법은 환자에게 투여되기 전에 DC를 활성화 또는 로딩하기 위해, 본 명세서에 기술된 폴리펩티드로 생체외에서 펄스된 자기유래 DC의 사용을 포함할 수 있다. 생체내 방법은 본 명세서에 기술된 폴리펩티드와 커플링된 항체를 사용하여 특이적 DC 수용체를 표적화하는 단계를 포함할 수 있다. DC-기반 면역원성 약학 조성물은 DC 활성인자 예컨대 TLR3, TLR-7-8, 및 CD40 효현제를 더 포함할 수 있다. DC-기반 면역원성 약학 조성물은 보강제, 및 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다.

[0363] 보강제는 면역원성 약학 조성물을 수용한 환자에서 유발된 면역 반응 (체액성 및/또는 세포)을 증가시키는데 사용될 수 있다. 때때로, 보강제는 Th1-유형 반응을 유발시킬 수 있다. 다른 경우에, 보강제는 Th2-유형 반응을

유발시킬 수 있다. Th1-유형 반응은 사이토카인 예컨대 IL-4, IL-5 및 IL-10의 생성을 특징으로 할 수 있는 Th2-유형 반응과 반대로 사이토카인 예컨대 IFN-γ의 생성을 특징으로 할 수 있다.

[0364] 일부 양태에서, 지질-기반 보강제, 예컨대 MPLA 및 MDP는 본 명세서에 개시된 면역원성 약학 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 모노포스포릴 리피드 A (MPLA)는 특이적 T 림프구에 리포솜 항원의 증가된 제시를 초래하는 보강제이다. 또한, 무라밀 디펩티드 (MDP)는 또한 본 명세서에 기술된 면역원성 약학 제제와 함께 적합한 보강제로서 사용될 수 있다.

[0365] 보강제는 또한 자극성 분자 예컨대 사이토카인을 포함할 수 있다. 사이토카인의 비제한적인 예는 CCL20, α-인터페론 (IFNα), β-인터페론 (IFNβ), γ-인터페론 (IFNγ), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), TNFα, GM-CSF, 상피 성장 인자 (EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인 (CTACK), 상피 흉선-발현 케모카인 (TECK), 점막-연관 상피 케모카인 (MEC), IL-12, IL-15, IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1-, IL-8, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DRS, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 캐스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-I, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAPI, 및 TAP2를 포함한다.

[0366] 추가 보강제는 MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, IL-22, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 캐스파제 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK 리간드, Ox40, Ox40 리간드, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이의 기능성 단편을 포함한다.

[0367] 일부 양태에서, 보강제는 Toll 유사 수용체의 조절인자일 수 있다. Toll-유사 수용체의 조절인자의 예는 TLR9 효현제를 포함하고, Toll-유사 수용체의 소형 분자 조절인자 예컨대 이미퀴모드에 제한되지 않는다. 때때로, 보강제는 박테리아 톡소이드, 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 블록 중합체, 알루미늄 염, 리포솜, CpG 중합체, 수중유 에멀션, 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 때때로 보강제는 수중유 에멀션이다. 수중유 에멀션은 적어도 하나의 오일 및 적어도 하나의 계면활성제를 포함할 수 있고, 오일(들) 및 계면활성제(들)는 생분해성 (대사가능) 및 생체적합성이다. 에멀션 중 유적은 직경이 5 μm 미만일 수 있고, 미크론 이하의 직경도 가질 수 있으며, 이들 소형 크기는 안정한 에멀션을 제공하도록 미세유동화기로 획득될 수 있다. 크기가 220 nm 미만인 액적은 필터 멸균을 겪을 수 있다.

[0368] 일부 예에서, 면역원성 약학 조성물은 담체 및 부형제 (제한없이 완충제, 탄수화물, 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신, 항산화제, 정균제, 킬레이트화제, 현탁제, 증점제 및/또는 보존제 포함), 물, 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원의 것들을 포함한 오일, 예컨대 피넛유, 대두유, 미네랄유, 참깨유 등, 염수 용액, 수용성 덱스트로스 및 글리세롤 용액, 풍미제, 착색제, 탈점착제 및 다른 허용되는 첨가제, 보강제, 또는 결합제, 생리적 조건과 비슷하기 위해 필요한 다른 약학적으로 허용되는 보조제 물질, 예컨대 pH 완충제, 등장성 조절제, 유화제, 습윤제 등을 포함한다. 부형제의 예는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 다른 예에서, 약학 조제물은 보존제가 실질적으로 없다. 다른 예에서, 약학 조제물은 적어도 하나의 보존제를 함유할 수 있다. 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체가 본 명세서에 기술된 약학 조성물을 투여하기 위해 적용될 수 있지만, 담체의 유형은 투여 방식에 따라 다양할 것임을 인지할 것이다.

[0369] 면역원성 약학 조성물은 보존제 예컨대 티오머살 또는 2-페녹시에탄올을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 면역원성 약학 조성물은 수은성 물질이 실질적으로 없고 (예를 들어, <10 μg/mL), 예를 들어, 티오머살-무함유이다. α-토코페롤 숙시네이트는 수은 화합물의 대안으로서 사용될 수 있다.

[0370] 등장성을 제어하기 위해서, 생리적 염 예컨대 나트륨 염이 면역원성 약학 조성물에 포함될 수 있다. 다른 염은 염화칼슘, 인산이수소칼슘, 인산이나트륨, 및/또는 염화마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0371] 면역원성 약학 조성물은 200 mOsm/kg 내지 400 mOsm/kg, 240-360 mOsm/kg, 또는 290-310 mOsm/kg 범위 이내의 삼투질농도를 가질 수 있다.

[0372] 면역원성 약학 조성물은 하나 이상의 완충제, 예컨대 Tris 완충제; 보레이트 완충제; 숙시네이트 완충제; 히스티딘 완충제 (특히 알루미늄 히드록시드 보강제와 함께); 또는 시트레이트 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는, 일부 경우에, 5-20 또는 10-50 mM 범위로 포함된다.

[0373] 면역원성 약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 약 8.5, 약 6.0 내지 약 8.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 또는 약 7.0 내지 약 7.8일 수 있다.

[0374] 면역원성 약학 조성물은 멸균될 수 있다. 면역원성 약학 조성물은 무-발열원성일 수 있고, 예를 들어, 용량 당 <1 EU (내독소 단위, 표준 척도)를 함유하고, 용량 당 <0.1 EU일 수 있다. 조성물은 글루텐 무함유일 수 있다.

[0375] 면역원성 약학 조성물은 세제 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 에스테르 계면활성제 ('Tweens'로 알려짐), 또는 옥토시놀 (예컨대 옥토시놀-9 (Triton X-100) 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올)을 포함할 수 있다. 세제는 오직 미량으로만 존재할 수 있다. 면역원성 약학 조성물은 1 mg/mL 미만으로 각각의 옥토시놀-10 및 폴리솔베이트 80을 포함할 수 있다. 미량의 다른 잔류 성분은 항생제 (예를 들어, 네오마이신, 카나마이신, 폴리믹신 B)일 수 있다.

[0376] 면역원성 약학 조성물은 당분야에 충분히 공지된, 적합한 비히클 중 멸균 용액 또는 현탁액으로서 제제화될 수 있다. 약학 조성물은 통상의, 충분히 공지된 멸균 기술을 통해 멸균될 수 있거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 최종 수성 용액은 그 자체로 사용을 위해 포장될 수 있거나, 또는 동결건조될 수 있고, 동결건조 조제물은 투여 전에 멸균 용액과 배합된다.

[0377] 예를 들어, 하나 이상의 보강제와 조합하여, 본 명세서에 개시된 활성제 예컨대 면역 세포를 포함하는 약학 조성물은 소정 몰비를 포함하도록 제제화될 수 있다. 하나 이상의 보강제와 조합하여, 활성제 예컨대 본 명세서에 기술된 면역 세포의 약 99:1 내지 약 1:99의 몰비가 사용될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 보강제와 조합하여, 활성제 예컨대 본 명세서에 기술된 면역 세포의 몰비의 범위는 약 80:20 내지 약 20:80; 약 75:25 내지 약 25:75, 약 70:30 내지 약 30:70, 약 66:33 내지 약 33:66, 약 60:40 내지 약 40:60; 약 50:50; 및 약 90:10 내지 약 10:90으로부터 선택될 수 있다. 하나 이상의 보강제와 조합하여, 활성제 예컨대 본 명세서에 기술된 면역 세포의 몰비는 약 1:9일 수 있고, 일부 경우에 약 1:1일 수 있다. 하나 이상의 보강제와 조합하여, 활성제 예컨대 본 명세서에 기술된 면역 세포는 동일 단위 제형 예를 들어, 하나의 바이알, 좌제, 정제, 캡슐, 에어로졸 스프레이로 함께 제제화될 수 있거나; 또는 각각의 작용제, 형태, 및/또는 화합물은 별도 단위로, 예를 들어, 2개 바이알, 좌제, 정제, 2개 캡슐, 정제 및 바이알, 에어로졸 스프레이 등으로 제제화될 수 있다.

[0378] 일부 예에서, 면역원성 약학 조성물은 추가 작용제와 함께 투여될 수 있다. 추가 작용제의 선택은 적어도 부분적으로, 치료되는 병태에 의존적일 수 있다. 추가 작용제는 예를 들어, 체크포인트 억제제 예컨대 항-PD1, 항-CTLA4, 항-PD-L1, 항 CD40, 또는 항-TIM3 작용제 (예를 들어, 항-PD1, 항-CTLA4, 항-PD-L1, 항 CD40, 또는 항-TIM3 항체); 또는 예를 들어, 염증성 병태를 치료하는데 사용되는 약물 예컨대 NSAID, 예를 들어, 이부프로펜, 나프록센, 아세트아미노펜, 케토프로펜, 또는 아스피린을 포함한, 병원체 감염 (예를 들어, 바이러스 감염)에 대한 치료적 효과를 갖는 임의 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 체크포인트 억제제는 니볼루맙 (ONO-4538/BMS-936558, MDX1 106, OPDIVO), 펨브롤리주맙 (MK-3475, KEYTRUDA), 피딜리주맙 (CT-011), 및 MPDL3280A (ROCHE)로 이루어진 군에서 선택되는 PD-1/PD-L1 길항제일 수 있다. 다른 예로서, 제제는 하나 이상의 보충제, 예컨대 비타민 C, E 또는 다른 항산화제를 추가로 함유할 수 있다.

[0379] 하나 이상의 보강제와 조합하여, 활성제 예컨대 본 명세서에 기술된 면역 세포를 포함하는 약학 조성물은 예를 들어, 투여할 수 있는 조제물로 활성제의 프로세싱을 촉진하는, 부형제, 희석제, 및/또는 보조제를 포함하는, 하나 이상의 생리적으로 허용되는 담체를 사용하여 통상의 방식으로 제제화될 수 있다. 적절한 제제는 적어도 부분적으로 선택된 투여 경로에 의존적일 수 있다. 본 명세서에 기술된 작용제(들)는 경구, 구강, 국소, 직장, 경피, 경점막, 피하, 정맥내, 및 근육내 적용을 비롯하여, 흡입을 포함한, 수많은 투여 경로 또는 방식을 사용해 환자에게 전달될 수 있다.

[0380] 활성제는 비경구 투여 (예를 들어, 주사, 예를 들어, 볼러스 주사 또는 연속 주입)를 위해 제제화될 수 있고 앰

풀, 사전 충전 시린지, 소부피 주입 또는 보존제 첨가된 다수-용량 용기의 단위 용량 형태로 존재할 수 있다. 조성물은 현탁액, 용액, 또는 유성 또는 수성 비히클 중 에멀션, 예를 들어 수성 폴리에틸렌 글리콜 중 용액같은 형태를 취할 수 있다.

[0381] 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 보존제 또는 안정화제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 보존제 또는 안정화제는 사이토카인, 성장 인자 또는 보강제 또는 화학 물질로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 하나의 냉동-해동 사이클을 통해서 세포 생존능을 보존하는데 도움을 주는 적어도 하나의 작용제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 하나 초과의 냉동-해동 사이클을 통해 세포 생존능을 보존하는데 도움을 주는 적어도 하나의 작용제를 포함한다.

[0382] 주사용 제제 경우, 비히클은 수성 용액 또는 오일 현탁액, 또는 수성 용액, 또는 참께유, 옥수수유, 면실유, 또는 땅콩유를 비롯하여, 엘릭시르, 만니톨, 덱스트로스 존재의, 오일 현탁액, 또는 에멀션, 또는 멸균 수성 용액, 및 유사한 약학 비히클을 포함하여, 적합하다고 당분야에 공지된 것들로부터 선택될 수 있다. 제제는 생체적합성, 생분해성 중합체 조성물, 예컨대 폴리(락트-코-글리콜)산을 포함할 수 있다. 이들 물질은 약물이 로딩되고 우수한 지속 방출 성능을 제공하도록 더욱 코팅 또는 유도체화되는, 미세구 또는 나노구로 만들어질 수 있다. 안구주변 또는 안구내 주사에 적합한 비히클은 예를 들어, 주사 등급 물 중 치료제의 현탁액, 리포솜 및 친지성 물질에 적합한 비히클을 포함한다. 안구주변 또는 안구내 주사를 위한 다른 비히클은 당분야에 충분히 공지되어 있다.

[0383] 일부 예에서, 약학 조성물은 인간에게 정맥내 투여에 적합하도록 약학 조성물로서 통상의 절차에 따라서 제제화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 완충제 중 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 국소 마취제 예컨대 주사 부위의 통증을 완화시키는 리도카인을 포함한다. 일반적으로, 성분은 단위 제형, 예를 들어, 활성제의 분량이 표시된 앰풀 또는 샤세같은 기밀 밀봉 용기 중 무수 농축물 또는 건조 동결건조 분말로서, 함께 혼합되거나 또는 별도로 공급된다. 조성물을 주입으로 투여하려는 경우에, 멸균 약학 등급 물 또는 염수를 함유하는 주입병에 분배될 수 있다. 조성물이 주사를 통해 투여되는 경우에 주사용 멸균수 또는 염수의 앰풀이 제공되어서 투여 전에 성분을 혼합할 수 있다.

[0384] **제조 방법**:

[0385] 본 명세서는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 본 명세서는 T 세포 조성물, 예컨대 치료적 T 세포 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 방법은 항원 특이적 T 세포를 확장 또는 유도시키는 단계를 포함할 수 있다. T 세포의 제조 (예를 들어, 유도 또는 확자)는 또한 T 세포의 제작이라고도 할 수 있고, 광범위하게, 임의 유형의 T 세포 (예를 들어, $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포)를 단리, 자극, 배양, 유도, 및/또는 확장시키는 절차를 포괄한다. 일 양태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 APC를 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 세포가 고갈된 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 단계를 포함하고, 방법은 APC를 CD11b 및/또는 CD19를 발현하는 세포가 고갈된 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 APC를 임의의 CD11b 및/또는 CD19 및/또는 CD14 및/또는 CD25 또는 이의 임의 조합을 발현하는 세포가 고갈된 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0386] 제2 양태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0387] 제3 양태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및 이후에 생물학적 샘플의 적어도 하나의 T 세포를 APC와 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0388] 제4 양태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과, 하나 이상의 APC 조제물의 제1 APC 조제물과 인큐베이션시키는 단계로부터 28일 미만의 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 항원 특이

적 기억 T 세포가 확장되거나, 또는 적어도 하나의 항원 특이적 미경험 T 세포가 유도된다.

[0389] 제5 양태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 3 이하의 APC 조제물과 3 이하의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 항원 특이적 기억 T 세포가 확장되거나 또는 적어도 하나의 항원 특이적 미경험 T 세포가 유도된다.

[0390] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포가 되도록 T 세포를 자극하는 단계를 포함하고, 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 $CD4^+$ T 세포, 총 $CD8^+$ T 세포, 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 3 이하의 APC 조제물과 3 이하의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포가 되도록 T 세포를 자극하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 2 이하의 APC 조제물과 2 이하의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포가 되도록 T 세포를 자극하는 단계를 포함한다.

[0391] 일부 실시형태에서, 본 명세서는 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포가 되도록 T 세포를 자극하는 단계를 포함하고, APC 조제물은 하나 이상의 세포 표면 마커를 발현하는 세포가 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된 PBMC 세포 개체군이다. 일부 실시형태에서, CD14+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD25+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD19+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD3+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD25+ 세포 및 CD14+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 및 CD25+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 및 CD14+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+, CD14+ 및 CD25+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+, 및 CD19+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+, CD19+ 및 CD25+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, CD11b+, CD14+, CD19+ 및 CD25+ 세포는 APC 개체군의 항원 로딩 이전에 고갈된다. 일부 실시형태에서, 방법은 상기 기술된 임의의 고갈된 APC 개체군에, CD3+ 세포가 고갈된 APC 농축된 세포 PBMC-유래 개체군을 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, APC 농축된 세포 PBMC-유래 개체군은 CD3+가 고갈되고 CD11b+, CD14+, CD19+, 또는 CD25+ 중 어느 하나 이상이 고갈된 세포이다.

[0392] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 PBMC 샘플에, 하나 이상의 항원성 펩티드 또는 이를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 첨가하여, PBMC 내 T 세포에 대해 항원 제시를 위해 항원으로 PBMC 내 APC를 로딩하는 단계를 포함한다.

[0393] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 적어도 하나의 항원 제시 세포 (APC)를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 CD11c를 발현하는 세포를 농축하여, $CD11c^+$ 세포 농축된 샘플을 수득하는 단계; (c) $CD11c^+$ 세포 농축된 샘플을 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자와 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (d) 적어도 하나의 펩티드를 (c)의 $CD11c^+$ 농축된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계; (e) APC 펩티드 로딩된 샘플을 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자와 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 성숙 APC 샘플을 수득하는 단계; (f) 성숙 APC 샘플의 APC를 PBMC를 포함하는 CD11b 및/또는 CD14 및/또는 CD25 고갈된 샘플과 제4 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (g) PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제5 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (h) PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제6 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및 (i) PBMC의 적어도 하나의 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0394] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 적어도 하나의 항원 제시 세포 (APC)를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 CD14를 발현하는 세포를 농축시켜서, $CD14^+$ 세포 농축된 샘플을 수득하는 단계; (c) $CD14^+$ 세포 농축된 샘플을 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자와 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (d) 적어도 하나의 펩티드를 (c)의 $CD14^+$ 농축된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계; (e) APC 펩티드 로딩된 샘플을 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자와 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 성숙 APC 샘플을 수득하는 단계; (f) 성숙 APC 샘플의 APC와 PBMC를 포함하는 CD14 및/또는 CD25 고갈된 샘플과 제4 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (g) PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제5 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (h) PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제6 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및 (i) PBMC의 적어도 하나의 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0395] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 적어도 하나의 APC 및 적어도 하나의 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 CD11b 및/또는 CD19를 발현하는 세포를 고갈시켜서, CD11b 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플을 수득하는 단계; (c) CD11b 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플을 FLT3L과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (d) 적어도 하나의 펩티드를 (c)의 CD11b 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계; (e) APC 펩티드 로딩된 샘플을 적어도 하나의 PBMC와 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제1 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (f) 제1 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제4 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제2 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (g) 제2 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제5 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제3 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (h) 제3 자극된 PBMC 샘플의 적어도 하나의 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0396] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 적어도 하나의 APC 및 적어도 하나의 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 CD11b 및/또는 CD19 및/또는 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 세포를 고갈시켜서, CD11b 및/또는 CD19 세포 고갈된 샘플을 수득하는 단계; (c) CD11b 및/또는 CD19 및/또는 CD14 및/또는 CD25 세포 고갈된 샘플을 FLT3L과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (d) 적어도 하나의 펩티드를 (c)의 CD11b 및/또는 CD19 및/또는 CD14 및/또는 CD25 세포 고갈된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계; (e) APC 펩티드 로딩된 샘플을 적어도 하나의 PBMC와 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제1 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (f) 제1 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제4 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제2 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (g) 제2 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제5 기간 동안 접촉시켜서, 제3 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (h) 제3 자극된 PBMC 샘플의 적어도 하나의 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0397] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 적어도 하나의 APC 및 적어도 하나의 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플로부터 CD14 및/또는 CD25 발현 세포를 고갈시켜서, CD14 및/또는 CD25 세포 고갈된 샘플을 수득하는 단계; (c) CD14 및/또는 CD25 세포 고갈된 샘플을 FLT3L과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; (d) 적어도 하나의 펩티드를 (c)의 CD14 및/또는 CD25 세포 고갈된 샘플과 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, APC 펩티드 로딩된 샘플을 수득하는 단계; (e) APC 펩티드 로딩된 샘플을 적어도 하나의 PBMC 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제1 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (f) 제1 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제4 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제2 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (g) 제2 자극된 PBMC 샘플의 PBMC를 성숙 APC 샘플의 APC와 제5 기간 동안 인큐베이션시켜서, 제3 자극된 PBMC 샘플을 수득하는 단계; (h) 제3 자극된 PBMC 샘플의 적어도 하나의 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0398] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 APC를 CD14 및/또는 CD25를 발현하는 세포가 고갈된 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과, 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물의 제1 APC 조제물과 인큐베이

션시키는 단계로부터 28일 미만의 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 항원 특이적 기억 T 세포가 확장되거나, 또는 적어도 하나의 항원 특이적 미경험 T 세포가 유도된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 3 이하의 APC 조제물과 3 이하의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 항원 특이적 기억 T 세포가 확장되거나, 또는 적어도 하나의 항원 특이적 미경험 T 세포가 유도된다.

[0400] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 면역 세포의 개체군 (예를 들어, PBMC)을 APC에 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 면역 세포의 개체군 (예를 들어, PBMC)을 APC와 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 생물학적 샘플 유래이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 CD14 발현 세포가 고갈된 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플) 유래이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 CD25 발현 세포가 고갈된 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플) 유래이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 CD14 발현 세포 및 CD25 발현 세포가 고갈된 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플) 유래이다.

[0401] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및 이후에 생물학적 샘플의 적어도 하나의 T 세포를 APC와 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0402] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC와 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 (예를 들어, 시간 기간 동안) 인큐베이션시키는 단계; 및 이어서 생물학적 샘플의 T 세포를 APC에 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물에 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물에 대해 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플)로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 별도 시간 기간은 면역 세포의 개체군과 하나 이상의 APC 조제물의 제1 APC 조제물을 인큐베이션시키는 단계로부터 계산하여 28일 미만이다.

[0403] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 면역 세포의 개체군을 APC에 대해 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 면역 세포의 개체군은 PBMC를 포함하는 생물학적 샘플 유래이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 면역 세

포의 개체군을 APC에 대해 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함하고, 면역 세포의 개체군은 CD14 및/또는 CD25 발현 세포가 고갈된 생물학적 샘플 유래이다.

[0404] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC와 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다.

[0405] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 제조하는 방법은 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)를 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군과 인큐베이션시키는 단계; 및 이어서 생물학적 샘플의 T 세포를 APC와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0406] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포를 유도 또는 확장시키는 단계를 포함하고, 하나 이상의 별도 시간 기간은 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물의 제1 APC 조제물과 인큐베이션시키는 단계로부터 계산하여 28일 미만이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계는 IL-7, IL-15, 또는 이의 조합을 함유하는 배지에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 배지는 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1 (IDO) 억제제, 항-PD-1 항체, IL-12, 또는 이의 조합을 더 포함한다. IDO 억제제는 에파카도스타트, 나복시모드, 1-메틸트립토판, 또는 이의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, IDO 억제제는 항원-특이적 $CD8^+$ 세포의 수를 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, IDO 억제제는 기억 $CD8^+$ T 세포 반응의 기능적 프로파일을 유지할 수 있다. PD-1 항체는 항원-특이적 기억 CD8+ T 세포 반응의 절대수를 증가시킬 수 있다. PD-1 항체는 이러한 항체로 처치된 세포의 증식률을 증가시킬 수 있다. IL-12의 첨가는 항원-특이적 세포의 증가 및/또는 $CD8^+$ T 세포 빈도의 증가를 일으킬 수 있다.

[0407] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 하나 이상의 APC 조제물과 하나 이상의 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포를 확장 또는 유도시키는 단계를 포함하고, 항원 특이적 T 세포, 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포, 또는 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포, 총 $CD4^+$ T 세포, 총 $CD8^+$ T 세포, 총 면역 세포, 또는 총 세포의 적어도 약 0.00001%, 0.00002%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%이다.

[0408] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열에 특이적인 T 세포 수용체 (TCR)를 포함하는 항원 특이적 T 세포를 제조하는 방법은 생물학적 샘플로부터의 면역 세포의 개체군을 3 이하의 APC 조제물과 3 이하 별도 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 항원 특이적 T 세포가 되도록 T 세포를 자극하는 단계를 포함한다.

[0409] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 개체군은 CD14 및/또는 CD25 발현 세포가 고갈된 생물학적 샘플 유래이다. 일부 실시형태에서, APC는 FMS-유사 티로신 키나제 3 수용체 리간드 (FLT3L)-자극된 APC이다. 일부 실시형태에서, APC는 하나 이상의 APC 조제물을 포함한다. 일부 실시형태에서, APC 조제물은 3 이하의 APC 조제물을 포함한다. 일부 실시형태에서, APC 조제물은 하나 이상의 별도 시간 기간 이내에 순차적으로 면역 세포와 인큐베이션된다.

[0410] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 대상체 유래이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 예를 들어, 대상체는 환자 또는 공여자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 질환 또는 장애를 갖는다. 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시형태에서, 항원 특이적 T 세포는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 특이적 T 세포는 CD4 농축된 T 세포 및/또는 CD8 농축된 T 세포를 포함한다. 예를 들어, $CD4^+$ T 세포 및/또는 $CD8^+$ T 세포는 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 또는 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 특이적 T 세포는 미경험 $CD4^+$ 및/또는 미경험 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시형태에서, 항원 특이적 T 세포은 기억 $CD4^+$ 및/또는 기억 $CD8^+$ T 세포이다.

[0411] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열은 (A) 점 돌연변이 및 암 항원 펩티드는 상응하는 야생형 펩티드에 비해 큰 친화성 및 500 nM 미만의 IC_{50}로 대상체의 HLA 단백질에 결합하고, (B) 스플라이스-부위 돌연변이, (C) 프레임시프트 돌연변이, (D) 리드-쓰루 돌연변이, (E) 유전자-융합 돌연변이, 및 이의 조합으로부터 선택되는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서,적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 각각은 대상체 의해 발현되는 HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 각각은 대상체의 비-암 세포에 존재하는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 각각은 대상체의 암 세포의 발현된 유전자에 의해 코딩된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열 중 하나 이상은 8-50 천연 발생 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 펩티드 서열은 다수의 항원 펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 다수의 항원 펩티드 서열은 2-50, 3-50, 4-50, 5-5-, 6-50, 7-50, 8-50, 9-50, 또는 10-50 항원 펩티드 서열을 포함한다.

[0412] 일부 실시형태에서, APC는 적어도 하나의 항원 펩티드 서열의 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 항원 펩티드가 로딩된 APC를 포함한다. 일부 실시형태에서, APC는 자기유래 APC 또는 동종이계 APC이다. 일부 실시형태에서, APC는 수지상 세포 (DC)를 포함한다.

[0413] 일부 실시형태에서, 방법은 생물학적 샘플로부터 CD14 및/또는 CD25 발현 세포를 고갈시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD14^+$ 세포를 고갈시키는 단계는 CD14 결합제를 APC에 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, APC는 $CD14^+$ 단핵구로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, APC는 생물학적 샘플로부터 농축된다. 예를 들어, APC는 PBMC를 포함하는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 또는 정제될 수 있다.

[0414] 일부 실시형태에서, APC는 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자로 자극된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 IL-4, IFN-γ, LPS, GM-CSF, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7 또는 이의 조합을 포함한다.

[0415] 일부 실시형태에서, APC는 제2 생물학적 샘플 유래이다. 일부 실시형태에서, 제2 생물학적 샘플은 동일 대상체 유래이다.

[0416] 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 약 0.1% 내지 약 5%, 약 5 % 내지 10%, 약 10% 내지 15%, 약 15% 내지 20%, 약 20% 내지 25%, 약 25% 내지 30%, 약 30% 내지 35%, 약 35% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 약 60% 내지 65%, 또는 약 65% 내지 약 70%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 미경험 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 방법에서 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 백분율은 총 T 세포 또는 총 면역 세포의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 미경험 $CD8^+$ T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포의 백 분율은 최대로 약 0.5%, 1%, 2%, 3%,

4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플 중 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 백분율은 최대로 약 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%이다.

[0417] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 새로 수득되거나 또는 냉동 샘플이다.

[0418] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 APC 조제물을 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자를 포함하는 제1 배지와 제1 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 시간 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17, 또는 18일이다. 일부 실시형태에서, 제1 시간 기간은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18일 이하이다. 일부 실시형태에서, 제1 시간 기간은 적어도 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9일이다. 일부 실시형태에서, 제1 시간 기간은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이하이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-η, LPS, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, 또는 이의 임의 조합을 포함한다.

[0419] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 APC 조제물을 적어도 하나의 펩티드와 제2 시간 기간 동안 인큐베이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 시간 기간은 1시간 이하이다.

[0420] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 APC 조제물을 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자를 포함하는 제2 배지와 제3 시간 기간 동안 인큐베이션시켜서, 성숙 APC를 수득하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자는 GM-CSF (과립구 마크로파지 콜로니-자극 인자), IL-4, FLT3L, IFN-γ, LPS, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-α, R848 (레시퀴모드), LPS, ss-rna40, 폴리 I:C, CpG, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 시간 기간은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18일 이하이다. 일부 실시형태에서, 제3 시간 기간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17일이다. 일부 실시형태에서, 제3 시간 기간은 2, 3, 4, 또는 5일 이하이다. 일부 실시형태에서, 제3 시간 기간은 적어도 1, 2, 3, 또는 4일이다.

[0421] 일부 실시형태에서, 방법은 제3 시간 기간 이후 및 제4 시간 기간의 시작 이전에 제2 배지의 하나 이상의 사이토카인 또는 성장 인자를 제거하는 단계를 더 포함한다.

[0422] **시험관내 T 세포 유도를 위한 항원 로딩된 PBMC**

[0423] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공되는 방법은 인간 혈액 샘플로부터 PBMC를 단리하는 단계, 및 항원으로 PBMC를 직접적으로 로딩하는 단계를 포함한다. 항원과 직접 접촉된 PBMC는 식세포 작용을 통해 항원을 쉽게 흡수할 수 있고 배양중일 수 있거나 또는 배양물에 첨가될 수 있는 T 세포에 대해 항원을 제시한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공되는 방법은 PBMC를 인간 혈액 샘플로부터 단리하는 단계, 및 하나 이상의 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 mRNA를 PBMC로 뉴클레오펙션 또는 전기천공시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, DC로 항원 제시 세포 성숙화 대신에, PBMC로 전달된 항원은 시간 및 제조 효율 관점에서 큰 장점을 제공한다. PBMC는 하나 이상의 세포 유형이 더 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 항원 로딩의 초기 기간 동안 CD3+ 세포가 고갈될 수 있고 CD3+ 세포는 PBMC에 대한 배양물로 되돌아가서 CD3+ T 세포를 자극한다. 일부 실시형태에서, PBMC는 CD25+ 세포가 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 CD14+ 세포가 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 CD19+ 세포가 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 CD14 및 CD25 발현 세포 둘 모두가 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 세포는 항원 로딩 이전에 PBMC 샘플로부터 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, CD11b+ 및 CD25+ 세포는 항원 로딩 이전에 PBMC 샘플로부터 고갈될 수 있다.

[0424] 일부 실시형태에서, 인간 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC는 항원 로딩 이전에 가능하면 최소로 취급될 수 있다. PBMC의 증가된 취급, 예를 들어, 세포의 냉동 및 세동, 다수의 세포 고갈 단계 등은 세포 건강 및 생존능을 손상시킬 수 있다.

[0425] 일부 실시형태에서, PBMC는 요법의 대상체에 대해 동종이계이다. 일부 실시형태에서, PBMC는 항원 특이적 T 세포에 의한 양자 세포 요법의 대상체에 대해 동종이계이다.

[0426] 일부 실시형태에서, PBMC는 요법의 대상체에 대해 HLA-일치된다. 일부 실시형태에서, PBMC는 동종이계이고, 대상체의 HLA 아형에 대해 일치되는 반면, CD3+ T 세포는 자기유래이다. PBMC는 (예를 들어, RECON같은 펩티드 제시 분석 플랫폼의 분석으로부터 유래된) 개별 항원이 로딩되고, 항원 특이적 T 세포를 자극시키기 위해 T 세포를 포함하는 대상체의 PBMC와 공배양된다.

[0427] 일부 실시형태에서, mRNA는 흡수 및 항원 제시를 위한 면역원으로서 사용된다. PBMC를 로딩하기 위해 펩티드 항원에 대해 mRNA를 사용하는 한가지 장점은 RNA가 자기 보강성이고, 추가 보강제를 요구하지 않는다는 것이다. mRNA를 사용하는 다른 장점은 펩티드를 내생적으로 프로세싱하고 제시한다는 것이다. 일부 실시형태에서, mRNA는 에피토프를 포함하는, 9-10개의 아미노산 펩티드를 코딩하는, 쇼트머 구성체를 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 약 25개의 아미노산 펩티드를 코딩하는, 롱머 구성체를 포함한다. 일부 실시형태에서, mRNA는 다수 에피토프의 콘카타머형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 콘카타머는 동일한 항원성 단백질로부터의 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 콘카타머는 몇몇 상이한 항원성 단백질로부터의 하나 또는 에피토프들을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예가 실시예 섹션에 기술된다. 항원 로딩에 의한 PBMC의 항원 로딩은 PBMC로 핵산의 전달 및 도입의 다양한 기전을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 전달 또는 도입 기전은 형질감염, 전기천공, 뉴클레오펙션, 화학 전달, 예를 들어, 지질 캡슐화 또는 리포솜 매개 전달을 포함한다.

[0428] T 세포를 자극하기 위해 항원 로딩된 PBMC의 사용은 T 세포 자극 이전에 PBMC 샘플로부터 DC를 생성하는 방법에서 요구되는 성숙화 시간을 절약한다. 일부 실시형태에서, 항원 로딩된 PBMC, 예를 들어, APC로서 mRNA 로딩된 PBMC의 사용은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일까지 총 제조 시간을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, APC로서 항원 로딩된 PBMC의 사용은 3일까지 총 제조 시간을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, APC로서 항원 로딩된 PBMC의 사용은 4일까지 총 제조 시간을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, APC로서 항원 로딩된 PBMC의 사용은 5일까지 총 제조 시간을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, APC로서 항원 로딩된 PBMC의 사용은 6일까지 총 제조 시간을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, APC로서 항원 로딩된 PBMC의 사용은 7일까지 총 제조 시간을 감소시킨다.

[0429] 일부 실시형태에서, 항원으로서 mRNA의 사용은 핵산을 설계 및 제조하고, PBMC를 형질감염시키는 것이 용이하기 때문에 바람직할 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 로딩된 PBMC는 T 세포를 자극시킬 수 있고, 더 높은 항원 특이적 T 세포를 생성시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 로딩된 PBMC는 T 세포를 자극시킬 수 있고 더 높은 수율로 항원 특이적 T 세포를 생성시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 로딩된 PBMC는 T 세포를 자극시킬 수 있고, 입력 항원의 더 높은 표시를 갖는, 즉 다양한 항원에 반응성인 항원 특이적 T 세포를 생성시킨다. 일부 실시형태에서, mRNA 로딩된 PBMC는 확장된 세포의 풀에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 항원 반응성을 갖는 T 세포를 자극할 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 로딩된 PBMC는 통상의 항원 로딩된 APC (예컨대, 펩티드 로딩된 DC)에 비해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 항원 반응성을 갖는 T 세포를 자극할 수 있다.

[0430] **치료 방법**

[0431] 본 명세서는 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 방법은 I. 암 네오항원 로딩된 항원 제시 세포 (APC)를 단리된 T 세포와 생체외에서 접촉시키는 단계로서, 암 네오항원 로딩된 항원 제시 세포 (APC)는 CD11b 고갈된 것인 단계; II. 생체외 암 면역요법을 위한 세포 조성물을 위해 암 네오항원 프라임된 T 세포를 제조하는 단계; 및 III. 대상체에서 암 면역요법을 위한 세포 조성물을 투여하는 단계로서, 암과 관련된 적어도 하나 이상의 병태 또는 증상은 투여에 의해 감소 또는 경감되어서, 대상체를 치료하는 단계로서, 암 네오항원 로딩된 APC 및 암 네오항원 프라임된 T 세포는 각각이 대상체에서 발현되고 네오항원이 특이적으로 결합할 수 있는 HLA 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질을 발현하는 것인 단계를 포함한다.

[0432] 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포 중 하나 이상을 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포를 포함하는 치료 조성물은 주사를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, T 세포를 포함하는 치료 조성물은 주입으로 투여된다. 투여가 주사에 의한 경우에, 활성제는 수성 용액, 특히 생리적 상용성 완충제 예컨대 행크액, 링거액 또는 생리적 염수 완충액 중에 제제화될 수 있다. 용액은 제제화제 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 다른 실시형태에서, 약학 조성물은 보강제 또는 펩티드에 의해 자극된 면역 반응을 증강시키도록 첨가되는 임의의 다른 물질을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 명세서에 기술된 약학 조성물로서 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포 중 하나 이상을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 약학 조성물은 보존제 또는 안정화제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 보존제 또는 안정화제는 사이토카인, 성장 인자 또는 보강제 또는 화학 물질로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 특이적 T 세포는 대상체로부터의 PBMC 샘플을 수집하고 28일 이내에 대상체에게 투여된다.

[0433] 이전에 기술된 제제이외에도, 활성제는 또한 데포 조제물로서 제제화될 수 있다. 이러한 장기간 작용성 제제는

이식 또는 경피 전달 (예를 들어, 피하 또는 근육내), 근육내 주사 또는 경피 팻치의 사용을 통해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 작용제는 적합한 중합성 또는 소수성 재료 (예를 들어, 허용되는 오일 중 에멀션으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어 난용성 염으로서 제제화될 수 있다.

[0434] 본 명세서는 또한 질환, 장애 또는 병태를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 치료 방법은 질환, 장애 또는 병태를 갖는 대상체에게 본 명세서에 개시된 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0435] 본 개시는 면역원성 요법을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 질환 (예컨대, 암 또는 바이러스 감염)을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 본 명세서에 제공되는 방법에 따라 면역원성 항원 특이적 T 세포를 포함하는 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 바이러스 항원을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원은 종양 항원을 포함한다.

[0436] 제조할 수 있는 치료제의 비제한적인 예는 펩티드-기반 요법, 핵산-기반 요법, 항체 기반 요법, T 세포 기반 요법, 및 항원-제시 세포 기반 요법을 포함한다.

[0437] 일부 다른 양태에서, 본 명세서는 요법에 사용을 위한 약물의 제조를 위한 조성물 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 면역원성 네오항원성 펩티드를 특이적으로 인식하는 T 세포의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 면역원성 네오항원성 펩티드를 특이적으로 인식하는 TCR, 예컨대 T 세포에서 발현되는 TCR의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0438] 일부 실시형태에서, 암은 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 백혈병, 편평 세포 암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종, 및 폐의 편평 암종 포함), 복막암, 간세포 암, 위 또는 위 암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 흑색종, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장 또는 신세포암, 간암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선암, 간 암종, 두경부암, 직결장암, 직장 암, 연조직 육종, 카포시 육종, B-세포 림프종 (저등급/여포성 비호지킨 림프종 (NHL), 소형 림프구성 (SL) NHL, 중간 등급/여포성 NHL, 중간 등급 미만성 NHL, 고등급 면역모세포성 NHL, 고등급 림프모구성 NHL, 고등급 소형 비-절단 세포 NHL, 벌키 질환 NHL, 맨틀 세포 림프종, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 골수종, 모발 세포 백혈병, 만성 골수모세포 백혈병, 및 이식후 림프증식성 장애 (PTLD), 모반증 연관 이상 혈관 증식, 부종, 메이그스 증후군, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0439] 본 명세서에서 기술되는 방법은 개인화 의료 상황에서 특히 유용하며, 본 명세서에 기술된 방법에 따라 확인된 면역원성 네오항원성 펩티드는 동일한 개체를 위한 치료제 (예컨대, 백신 또는 치료 항체)를 개발하는데 사용된다. 따라서, 대상체에서 질환을 치료하는 방법은 본 명세서에 기술된 방법에 따라서 대상체에서 면역원성 네오항원성 펩티드를 확인하는 단계; 및 펩티드 (또는 이의 전구체, 예컨대 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, mRNA))를 합성하는 단계; 및 확인된 네오항원에 특이적인 T 세포를 제조하는 단계; 및 네오항원 특이적 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체에서 질환을 치료하는 방법은 본 명세서에 기술된 방법에 따라 대상체에서 면역원성 네오항원성 펩티드를 확인하는 단계; 및 면역원성 네오항원성 펩티드 또는 이의 전구체를 코딩하는, 폴리뉴클레오티드, 예컨대 mRNA를 합성하는 단계; 및 확인된 네오항원에 특이적인 T 세포를 제조하는 단계; 및 네오항원 특이적 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0440] 본 명세서에서 제공하는 작용제 및 조성물은 단독으로 또는 통상의 치료 용법 예컨대 수술, 조사, 화학요법 및/또는 골수 이식 (자기유리, 동계, 동종이계, 또는 미관련)과 병용하여 사용될 수 있다. 종양 항원의 세트는 본 명세서에 기술된 방법을 사용해 확인할 수 있고 예를 들어, 거대 분획의 암 환자에서 유용하다.

[0441] 일부 실시형태에서, 적어도 하나 이상의 화학요법제는 면역원성 요법을 포함하는 조성물이외에도 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 화학요법제는 상이한 클래스의 화학요법제에 속할 수 있다.

[0442] 본 명세서에서 제공하는 치료 또는 사용 방법을 실행하면서, 치료제의 치료적 유효량이 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 치료적 유효량은 질환의 중증도, 대상체의 연령 및 상대적 건강, 사용되는 화합물의 역가 등에 의존하여 광범위하게 다양할 수 있다.

[0443] 대상체는 예를 들어 포유동물, 인간, 임산부, 고령자, 성인, 청소년, 아동, 소아, 유아, 영아, 신생아, 또는 신산아일 수 있다. 대상체는 환자일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 인간일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 소아 (사춘기 연령 이전의 어린 인간)일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 유아일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는

분유를 먹는 영아일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 임상 연구에 등록된 개체일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 실험실 동물, 예를 들어, 포유동물, 또는 설치류일 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 마우스일 수 있다. 일부 경우에,대상체는 비만 또는 과체중 대상체일 수 있다.

[0444] 일부 실시형태에서, 대상체는 하나 이상의 상이한 암 치료 양식으로 이전에 처치되었었다. 일부 실시형태에서, 대상체는 방사선요법, 화학요법, 또는 면역요법 중 하나 이상으로 이전에 처치되었었다. 일부 실시형태에서, 대상체는 1선, 2선, 3선, 4선, 또는 5선의 사전 요법으로 처치되었었다. 일부 실시형태에서, 사전 요법은 세포독성 요법이다.

[0445] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법으로 치료할 수 있는 질환 또는 병태는 암이다. 암은 비제어적인 방식으로 증식하고, 일부 경우에는 전이 (확산)되는 경향이 있는 세포의 이상 성장이다. 종양은 암성일 수 있거나 또는 양성일 수 있다. 양성 종양은 종양이 성장할 수 있지만 확산되지 않는 것을 의미한다. 암성 종양은 악성으로서, 성장되어 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다는 것을 의미한다. 암이 확산 (전이)되면, 새로운 종양은 본래 (원발성) 종양과 동일한 명칭을 갖는다.

[0446] 본 개시의 방법은 당분야에 공지된 임의 유형의 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 개시의 방법으로 치료하려는 암의 비제한적인 예는 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 신세포암 (예를 들어, 투명 세포 암종), 전립선암 (예를 들어, 호르몬 불응성 전립선 선암종), 췌장 선암종, 유방암, 결장암, 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐암), 식도암, 두경부의 편평 세포 암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 갑상선암, 교모세포종, 신경교종, 백혈병, 림프종, 및 다른 신생물성 악성종을 포함할 수 있다.

[0447] 추가로, 본 명세서에 제공되는 질환 또는 병태는 그의 성장이 본 개시의 치료 방법을 사용해 억제될 수 있는 난치성 또는 재발성 악성종을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 치료 방법으로 치료하려는 암은 암종, 편평 암종, 선암종, 육종, 자궁내막암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁관암, 원발성 복막암, 결장암, 직결장암, 항문성기 영역의 편평 세포 암종, 흑색종, 신장 세포 암종, 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 편평 세포 암종, 위암, 방광암, 담낭암, 간암, 갑상선암, 후두암, 타액선암, 식도암, 두경부암, 교모세포종, 신경교종, 두경부의 편평 세포 암종, 전립선암, 췌장암, 중피종, 육종, 혈액학적 암, 백혈병, 림프종, 신경종, 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 방법으로 치료하려는 암은 예를 들어, 암종, 편평 암종 (예를 들어, 자궁경관, 눈꺼풀, 결막, 질, 폐, 구강, 피부, 방광, 혀, 후두, 및 식도), 및 선암종 (예를 들어, 전립선, 소장, 자궁내막, 자궁경관, 대장, 폐, 췌장, 식도, 직장, 자궁, 위, 유선, 및 난소)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 방법으로 치료하려는 암은 육종 (예를 들어, 근원성 육종), 백혈증, 신경종, 흑색종, 및 림프종을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 방법으로 치료하려는 암은 유방암이다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 치료 방법으로 치료하려는 암은 삼중 음성유방암 (TNBC)이다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 치료 방법으로 치료하려는 암은 난소암이다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 치료 방법으로 치료하려는 암은 직결장암이다.

[0448] 일부 실시형태에서, 본 개시의 약학 조성물로 치료하려는 환자 또는 환자의 개체군은 고형 종양을 갖는다. 일부 실시형태에서, 고형 종양은 흑색종, 신장 세포 암종, 폐암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 담낭암, 후두암, 간암, 갑상선암, 위암, 타액선암, 전립선암, 췌장암, 또는 메르켈 세포 암종이다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 약학 조성물로 치료하려는 환자 또는 환자의 개체군은 혈액학적 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, 환자는 혈액학적 암 예컨대 미만성 거대 B 세포 림프종("DLBCL"), 호지킨 림프종 ("HL"), 비호지킨 림프종 ("NHL"), 소포성 림프종 ("FL"), 급성 골수성 백혈병 ("AML"), 또는 다발성 골수종 ("MM")을 갖는다. 일부 실시형태에서, 치료하려는 환자 또는 환자의 개체군은 난소암, 폐암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 갖는 갖는다.

[0449] 본 개시에 따라서 예방 및/또는 치료할 수 있는 암의 특정 예는 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 신세포암, 신장암, 다형성 교모세포종, 전이성 유방암; 유방 암종; 유방 육종; 신경섬유종; 신경섬유종증; 소아 종양; 신경모세포종; 악성 흑색종; 상피의 암종; 백혈병 예컨대 제한없이, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 예컨대 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병 백혈병 및 골수이형성성 증후군, 만성 백혈병 예컨대 제한없이, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모발 세포 백혈병; 진성다혈구증; 림프종 예컨대 제한없이 호지킨 질환, 비-호지킨 질환; 다발성 골수종 예컨대 제한없이 무증상성 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질 세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수외 형질세포종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증; 의미불명 단일클론 감마병증; 양성 단일클론 감마병증; 중쇄 질환; 골암 및 결합 조직 육종 예컨대 제한없이 뼈 육종, 골수종 뼈 질환, 다발성 골수종, 진주종-유도 뼈 골육

종, 뼈의 파제트병, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대 세포 종양, 뼈의 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 혈액육종 (혈관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관 육종, 신경집종, 횡문근육종, 및 활막 육종; 뇌종양 예컨대 제한없이, 신경교종, 성상세포종, 뇌간 신경교종, 상의세포종, 희소돌기신경교종, 비교세포 종양, 청각 신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 뇌수막종, 송과체종, 송과체모세포종, 및 원발성 뇌 림프종; 제한없이 선암종, 소엽 (소세포) 암종, 관내 암종, 수질성 유방암, 점액성 유방암, 관상 유방암, 유두양 유방암, 파제트병 (소아 파제트병 포함) 및 염증성 유방암을 포함한 유방암; 부신암 예컨대 제한없이 갈색세포종 및 부신피질 암종; 갑상선암 예컨대 제한없이 유두양 또는 여포성 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 역형성 갑상선암; 췌장암 예컨대 제한없이, 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, 비포마, 소마토스타틴-분비성 종양, 및 카시노이드 또는 도세포 종양; 뇌하수체 암 예컨대 제한없이 쿠싱병, 프로락틴-분비성 종양, 말단비대증, 및 요붕증; 안암 예컨대 제한없이 안구 흑색종 예컨대 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종, 및 섬모체 흑색종, 및 망막모세포종; 질암 예컨대 편평 세포 암종, 선암종, 및 흑색종; 외음부 암 예컨대 편평 세포 암종, 흑색종, 선암종, 기저 세포 암종, 육종, 및 파제트병; 자궁경부암 예컨대 제한없이, 편평 세포 암종, 및 선암종; 자궁암 예컨대 제한없이 자궁내막 암종 및 자궁 육종; 난소암 예컨대 제한없이, 난소 상피 암종, 경계성 종양, 생식세포 종양, 및 기질 종양; 자궁경부 암종; 식도암 예컨대 제한없이, 편평 암, 선암종, 선양 낭포 암종, 점막표피양 암종, 샘편평 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀양 암종, 및 귀리 세포 (소세포) 암종; 위암 예컨대 제한없이, 선암종, 균상 (용종), 궤양성, 표재 확산성, 미만성 확산성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종, 및 암육종; 결장암; 직결장암, KRAS 돌연변이된 직결장암; 결장 암종; 직장암; 간암 예컨대 제한없이 간세포 암종 및 간모세포종, 담낭암 예컨대 선암종; 담관암종 예컨대 제한없이 유두양, 결절성, 및 미만성; 폐암 예컨대 KRAS-돌연변이된 비소세포 폐암, 비소세포 폐암, 편평 세포 암종 (표피모양 암종), 선암종, 거대-세포 암종 및 소-세포 폐암; 폐 암종; 고환 암 예컨대 제한없이 생식선 종양, 정상피종, 역형성, 고전적 (전형적), 정모세포, 비정상피종, 배아 암종, 기형종 암종, 융모암종 (난황난 종양), 전립선암 예컨대 제한없이, 안드로겐-비의존성 전립선암, 안드로겐-의존성 전립선암, 선암종, 평활근육종, 및 횡문근육종; 음경암; 경구암 예컨대 제한없이 편평 세포 암종; 기저 암; 타액선암 예컨대 제한없이 선암종, 점막표피양 암종, 및 선양낭포 암종; 인두 암 예컨대 제한없이 편평 세포 암, 및 사마귀양; 피부 암 예컨대 제한없이, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 결절성 흑색종, 흑색점 악성 흑색종, 말단흑자 흑색종; 신장암 예컨대 제한없이 신장 세포 암, 선암종, 부신종, 섬유육종, 이행 세포 암 (신우 및/또는 자궁); 신세포 암종; 빌름스 종양; 방광암 예컨대 제한없이 이행 세포 암종, 편평 세포 암, 선암종, 암육종. 또한, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피육종, 중피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭선암종, 기관지성 암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두양 암종 및 유두양 선암종을 포함한다.

[0450] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법으로 생성된 양자 T 세포에 의한 치료는 특별한 환자 개체군의 치료에 대한 것이다. 일부 실시형태에서, 양자 T 세포는 소정 요법에 불응성인 환자의 개체군의 치료에 대한 것이다. 예를 들어, T 세포는 항-체크포인트 억제제 요법에 불응성인 환자의 개체군의 치료에 대한 것이다. 일부 실시형태에서, 환자는 흑색종 환자이다. 일부 실시형태에서, 환자는 전이성 흑색종 환자이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서는 절제불가 흑색종 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 절제불가 흑색종 환자는 본 명세서에 기술된 T 세포 요법 (예컨대 NEO-PTC-01)을 위해 선택된다. 절제불가 흑색종 대상체는 종양 침윤성 림프구에 의한 요법을 위한 후보가 아닐 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법으로 생성된 양자 T 세포에 의한 치료는 전이성 및 절제불가 흑색종 환자의 치료에 대한 것이다. 일부 실시형태에서, 환자는 항-PD1 요법에 불응성이다. 일부 실시형태에서, 환자는 항-CTLA-4 요법에 불응성이다. 일부 실시형태에서, 환자는 항-PD1 및 항-CTLA-4 요법 둘 모두에 불응성이다. 일부 실시형태에서, 요법은 정맥내 투여된다. 일부 실시형태에서, 요법은 주사 또는 주입에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 요법은 단일 용량, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 용량을 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 치료 또는 약학 조성물은 용량 당 약 10^9 이상의 총 세포수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 또는 약학 조성물은 용량 당 10^10 이상의 총 세포수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 또는 약학 조성물은 용량 당 10^11 이상의 총 세포수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 치료 또는 약학 조성물은 용량 당 10^12 이상의 총 세포수를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 용량 당 약 10^10 내지 약 10^11의 총 세포를 갖는 본 명세서에 기술된 바와 같은 치료 조성물이 투여되고, 세포는 품질이 검증되었고 출시 기준을 통과하였다.

[0451] **키트**

[0452] 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물은 투여를 위한 설명서와 함께 키트 형태로 제공될 수 있다. 전형적으로, 키트는 단위 제형으로, 용기 내 바람직한 네오항원 치료 조성물, 및 투여 설명서를 포함할 수 있다. 추가 치료제, 예를 들어, 사이토카인, 림포카인, 체크포인트 억제제, 항체가 또한 키트에 포함될 수 있다. 또한 바람직할 수

있는 다른 키트 성분은 예를 들어, 멸균 시린지, 부스터 용량, 및 다른 바람직한 부형제를 포함할 수 있다.

[0453] 키트 및 제조 물품이 또한 본 명세서에 기술된 하나 이상의 방법과 사용을 위해 본 명세서에서 제공된다. 키트는 하나 이상의 유형의 면역 세포를 함유할 수 있다. 키트는 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 항원 특이적 면역 세포 (예를 들어, 네오항원 특이적 T 세포) 생성에 유용한 시약, 펩티드, 및/또는 세포를 함유할 수 있다. 키트는 항원 특이적 면역 세포의 구성 및 전달에 필요한 보강제, 시약, 및 완충제를 더 함유할 수 있다.

[0454] 키트는 또한 하나 이상의 용기 예컨대 바이알, 튜브 등을 수용하도록 구획화된 캐리어, 패키지, 또는 용기를 포함할 수 있고, 각각의 용기(들)는 본 명세서에 기술된 방법에서 사용하고자 하는, 별개 구성요소 중 하나, 예컨대 폴리펩티드 및 보강제를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 재료 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다.

[0455] 본 명세서에서 제공되는 제조 물품은 패키징 재료를 함유한다. 약학 패키징 재료의 예는 블리스터 팩, 병, 튜브, 봉투, 용기, 병, 및 선택된 제제 및 의도하는 투여 및 치료 방식에 적합한 임의의 패키징 재료를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 키트는 전형적으로 함량을 열거한 라벨 및/또는 사용 설명서, 및 사용 설명서와 함께 패키지 삽입물을 포함한다. 설명서 세트가 또한 포함될 수 있다.

[0456] **실시예**

[0457] 본 개시는 하기 특별한 실시예를 통해서 더 상세히 기술될 것이다. 하기 실시예는 예시적인 목적으로 제공되며, 임의 방식으로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 당업자는 본 발명에 따른 대안적 실시형태를 산출하도록 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 비-결정적 매개변수를 쉽게 인식할 수 있다. 본 명세서에 열거된 모든 특허, 특허 출원, 및 인쇄 간행물은 그들 전문이 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0458] ***실시예의 요약:***

[0459] 하기 실시예 1 및 2는 T 세포 제조 프로토콜 (프로토콜 1 및 프로토콜 2)의 예이다. 예시적인 프로토콜의 개략도가 도 1B 및 도 1C에 도시된다. 실시예 21-23는 APC를 제조하는 단계 및 이들 2개 프로토콜을 도시한다. 실시예 12 및 14-16 및 표 2-5는 프로토콜 1 및 2로부터 수득된 결과를 요약한다. 실시예 13은 검사하게 되는 프로토콜의 매개변수를 기술한다.

[0460] 실시예 3-7 및 20은 프로토콜 1 및 프로토콜 2를 사용하는 $CD4^+$ 기억 T 세포 확장 및 $CD8^+$ 미경험 T 세포 유도 결과의 예이다. 유세포측정 분석 결과는 도 2B, 도 5A 및 B, 도 7, 도 10, 및 도 12-23에 도시된다.

[0461] 실시예 8-11 및 16-19는 본 명세서에 기술된 방법을 사용해 확장 또는 유도된 T 세포의 특이성, 표현형, 및/또는 기능을 평가하는데 사용되는 어세이 결과의 예이다. 도 25는 T 세포 제조 방법 및 T 세포의 특이성, 표현형, 및/또는 기능에 대한 이들 어세이의 사용에 대한 일반 개요를 도시한다.

[0462] **실시예 1 - T 세포 제조 프로토콜 1**

[0463] 이 실시예는 도 1B 및 1C에 예시된 바와 같은 T 세포 제조 프로토콜 1의 예를 제공한다.

[0464] *재료:*

[0465] DC 배지 (Cellgenix)

[0466] CD14 미세비드, 인간, Miltenyi #130-050-201

[0467] 사이토카인 및/또는 성장 인자

[0468] T 세포 배지 (AIM V + RPMI 1640 glutamax + 혈청 + PenStrep)

[0469] 펩티드 스톡 - 펩티드 당 1 mM (HIV A02 - 5-10 펩티드, HIV B07- 5-10 펩티드, DOM - 4-8 펩티드, PIN - 6-12 펩티드)

[0470] *절차:*

[0471] **단계 1: DC prep을 위한 단핵구 단리**

[0472] 1. 각 공여자에 대한 예상 DC 수율을 기반으로 해동하려는 PBMC의 근사치를 계산한다.

[0473] 2. PBMC를 해동하고 DC 배지 중에 ~$1x10^6$ - $1x10^8$ 세포/mL로 재현탁시킨다.

[0474] 3. 벤조나제 (1:1000 희석)를 첨가하고 캡을 느슨하게 하고 인큐베이터에 위치시킨다.

[0475] 4. 제조사 프로토콜에 따라서 $CD14^+$ 단핵구 농축을 수행한다.

[0476] 5. GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 및 폴리 I:C로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자가 존재하는 DC 배지 중에서 웰 당 $1x10^5$ - $1x10^7$ 로 6-웰 플레이트에 농축된 세포를 도말한다.

[0477] **단계 2: 펩티드 로딩 및 성숙화**

[0478] 1. 15 mL 튜브 중에서 시험 조건에 따라 DC를 계측하고 세포를 분할한다; 조건 당 0.01-1 백만개 세포.

[0479] 2. @ 1200 rpm에서 5분 동안 스핀시키고 50 - 400 ㎕ DC 배지에 재현탁시킨다. 펩티드(들)를 첨가하고 0.5-3시간 동안 캡을 느슨하게 하여 인큐베이터에 위치시킨다. 부피는 펩티드 당 1 mM의 농도로 펩티드 풀에 대해 계산되었다. A02 (5 펩티드) 및 B07 (5 펩티드)의 각각의 개별 풀의 부피는 펩티드 당 0.001 - 100 μM의 최종 농도로 웰 당 첨가되었다.

[0480] 3. 0.5 - 3시간 후에, 200 ㎕를 1.5 mL의 성숙화 혼합물을 함유하는 DC 배지에 첨가하고 세포를 24웰 플레이트로 옮긴다. 성숙화 혼합물은 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 및 폴리 I:C로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 함유한다.

[0481] **단계 3: 장기간 자극 (LTS) 실험의 설정**

[0482] 1. DC 플레이트의 웰로부터 모든 배지를 조심스럽게 제거하고, 각 웰을 24-웰 심부웰 블록의 별도 웰로 옮긴다.

[0483] 2. 0.5 - 3 mL T 세포 배지로 각 웰을 세척하고 심부웰 블록 중 DC 배지와 배합한다.

[0484] 3. 100 ㎕를 2 mL T 세포 배지에 각 웰에 첨가한다.

[0485] 4. DC를 1200 rpm에서 5분 동안 스핀 다운한다.

[0486] 5. 모든 상등액을 제거하고, 100 ㎕ 중 DC를 2 mL T 세포 배지에 재현탁시키고 다시 올바른 웰로 옮긴다.

[0487] 6. T 세포 배지 중에 PBMC를 해동시키고 $0.5x10^6$ - $4x10^6$ 세포/mL을 IL-7 및 IL-15 존재의 T 세포 배지에 재현탁시킨다.

[0488] 7. 0.5 - 3 mL의 제조된 PBMC를 각 웰에 첨가한다.

[0489] **단계 4: LTS 공급**

[0490] 배지가 노란색이면 글루코스 미터로 검토한다. 글루코스가 높은 채로 남아 있으면, IL-7 및 IL-15 존재의 배양물이 웰에 공급된다. 글루코스가 낮으면, 세포를 6 웰 플레이트 (4 mL/웰)로 확장시키고 IL-15 및 IL-7을 보충한다. 글루코스가 매우 낮으면, 6-웰 플레이트 중 6 mL/웰로 확장시킨다.

[0491] **단계 5: LTS 공급**

[0492] 1-4일마다 배양물을 공급하고, 새로운 IL-15/IL-7을 첨가하고 글루코스 농도가 낮아지면 필요에 따라 배양 부피를 확장시킨다.

[0493] **단계 6: 재-자극**

[0494] T 세포를 계측하고 펩티드-로딩된 DC의 새로운 뱃치로 단계 3으로부터 반복한다. 분석을 위해 남은 세포를 냉동시킨다.

[0495] **단계 7: LTS 공급**

[0496] -1-5일마다 배양물을 공급한다.

[0497] **단계 8: 재-자극**

[0498] T 세포를 계측하고 펩티드-로딩된 DC의 새로운 뱃치로 단계 3으로부터 반복한다. 분석을 위해 남은 세포를 냉동시킨다.

[0499] **단계 9: LTS 공급**

[0500] 1-5일마다 배양물을 공급한다.

[0501] **단계 10**

[0502] T 세포를 계측하고 분석을 위해 냉동시킨다.

[0503] **실시예 2 - T 세포 제조 프로토콜 2**

[0504] 이 프로토콜은 실시예 1에 기술된 프로토콜의 대안일 수 있다.

[0505] 실시예 2는 도 1에 예시된 바와 같은 예시적인 T 세포 제조 프로토콜 (프로토콜 2)을 제공한다.

[0506] *재료:*

[0507] AIM V 배지 (Invitrogen)

[0508] 배지 1 (RPMI 1640 glutamax + 혈청 + PenStrep)

[0509] 배지 2 (AIM V + RPMI 1640 glutamax + 혈청 + PenStrep)

[0510] *절차:*

[0511] **단계 1**: 배지 2 중 하나 이상의 사이토카인이 존재하는 24웰 플레이트의 각 웰에 4 백만 PBMC를 도말한다. 하나 이상의 사이토카인은 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 및 폴리 I:C로부터 선택된다.

[0512] **단계 2: 배지 2 중 펩티드 로딩 및 성숙화**

[0513] 1. 개별 웰에서 쇼트머의 경우 0.001 - 100 μM 및 롱머의 경우 0.001 - 100 μM의 최종 농도로 관심 스톡 펩티드 풀 (펩티드 없는 조건 제외)을 만들도록 혼합한다.

[0514] 2. 0.5 - 3시간 동안 인큐베이션한다.

[0515] 3. 스톡 성숙화 칵테일을 만들고 인큐베이션 후에 각 웰에 첨가하고 혼합한다. 성숙화 칵테일은 GM-CSF, IL-4, FLT3L, TNF-α, IL-1β, PGE1, IL-6, IL-7, IFN-α, R848, LPS, ss-rna40, 및 폴리 I:C로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 함유한다.

[0516] **단계 3**: 인간 혈청을 각 웰에 2.5-20 부피%의 최종 농도로 첨가하고 혼합한다.

[0517] **단계 4**: 배지의 50-90%를 IL-7 및 IL-15이 각각 0.005-500 ng/mL의 최종 농도로 보충된 새로운 배지 1로 조심스럽게 교체한다.

[0518] **단계 5**: 배지의 50-90%를 IL-7 및 IL-15가 각각 0.005-500 ng/mL의 최종 농도로 보충된 새로운 배지 1로 1-5일마다 조심스럽게 교체한다.

[0519] 비공급날 웰이 오렌지색에서 노란색으로 바뀐 경우 (투명한 배지 경우 글루코스 판독치)에, 존재하는 배지의 25-75%를 새로운 배지 1 및 IL-7/IL-15로 바꿔준다.

[0520] **단계 6**: 계측 및 냉동한다 (또는 T 세포 자극을 수행하기 위해서 다음 단계들에서 프로토콜 1의 단계 8 및/또는 단계 10으로 진행한다).

[0521] 단계 1에서 단계 6으로 배양 단계 동안, 펩티드-로딩된 DC는 프로토콜 1 "단계 1" 및 "단계 2"에서의 절차에 따라 동시에 제조될 수 있다

[0522] T 세포를 계측하고 펩티드-로딩된 DC의 새로운 배치로 T 세포를 자극한다. 분석을 위해 남은 세포를 냉동시킨다. T 세포 자극 절차는 프로토콜 1 "단계 3"의 절차에 따라 수행될 수 있다

[0523] **단계 7**: T 세포를 계측하고 펩티드-로딩된 DC의 새로운 배치에서 프로토콜 1 "단계 3"의 T 세포 자극 절차를 반복한다. 분석을 위해 남은 세포를 냉동시킨다.

[0524] **단계 8**: T 세포를 계측하고 분석을 위해 냉동시킨다.

[0525] **실시예 3 - $CD8^+$ T 세포 유도**

[0526] 인간 공여자 유래 PBMC 샘플은 프로토콜 1 또는 프로토콜 2에 따라서 항원 특이적 T 세포 유도를 수행하는데 사

용되었다. $CD8^+$ 기억 및 미경험 T 세포 유도는 상이한 프로토콜을 사용해 T 세포를 제조한 후 분석되었다. 세포 샘플은 분석을 위해 상이한 시점에서 채취할 수 있다. pMHC 멀티머는 유도 배양 중인 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 분율을 모니터링하는데 사용하였고 조합 코딩을 사용하여 동시에 다수의 T 세포 반응을 검출하는데 사용되었다. 도 2는 프로토콜 1 (prot. 1) 및 프로토콜 2 (prot. 2)를 사용하여 장형 펩티드 또는 단형 펩티드로 유도된 항원 특이적 $CD8^+$ 기억 T 세포의 분율을 보여주는 예시적인 결과를 도시한다. "원액"은 유도에 사용되는 T 세포를 함유하는 샘플이 전체 PBMC인 것을 의미한다. "$Treg^-$"는 유도에 사용된 T 세포를 함유하는 샘플이 CD25 발현 세포가 고갈된 PBMC인 것을 의미한다. 도 3은 쇼트머 (단형) 자극 또는 롱머 (장형)에 의한 유도 이후에 유세포측정으로 분석된 GAS7 펩티드에 반응된 항원 특이적 $CD8^+$ 미경험 T 세포의 분율을 보여주는 T 세포 반응 어세이의 예시적인 결과를 도시한다. 항원 특이적 기억 T 세포 및 미경험 PIN 특이적 T 세포의 분율의 증가가 단기간 자극 이후에 관찰될 수 있다. "장형" 또는 "롱머"는 면역원으로서 사용되는 펩티드이고, 약 16-25개의 아미노산 길이이다. "단형" 또는 "쇼트머"는 면역원으로서 사용되는 펩티드이고, 약 8-12개의 아미노산 길이이다.

[0527] **실시예 4 - $CD8^+$ T 세포 유도**

[0528] $CD8^+$ T 세포 유도는 상이한 프로토콜을 사용하여 T 세포 제조 이후에 분석되었다. 유도된 T 세포는 검사 웰 중 상이한 항원 펩티드와 인큐베이션되었고 펩티드에 반응하는 T 세포의 분율은 유세포측정으로 분석하였다. pMHC 멀티머는 유도 배양물 중 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포의 분율을 모니터링하는데 사용되었고 조합 코딩을 사용하여 동시에 다수의 T 세포 반응을 검출하는데 사용되었다. 히트율을 사용하여 T 세포가 항원 펩티드에 어떻게 반응하는가를 도시하는데 사용될 수 있다. 히트율은 양성 반응 검사웰의 수를 검사웰의 총수로 나눈 것으로 정의된다. 실험은 중복으로 수행되고, 히트율은 중복 웰에서 확인되었다. 도 4는 프로토콜 1 (prot. 1) 및 프로토콜 2 (prot. 2)를 사용한 유도 이후에 HIV 단형 펩티드, 이전에 확인된 네오항원 (PIN) 단형 펩티드, 또는 PIN 장형 펩티드로 유도된 $CD8^+$ T 세포의 분율을 보여주는 결과의 예를 도시한다. "전체 PBMC"는 유도에 사용된 T 세포를 함유하는 샘플이 전체 PBMC인 것을 의미한다. "$CD25^-$ PBMC"는 유도에 사용되는 T 세포를 함유하는 샘플이 $CD25^+$ 세포가 고갈된 것을 의미한다. 장기간 및 단기간 유도가 도시된다. 도 6은 2명 인간 공여자로부터 표시된 장기간 및 단기간 유도에 의해 유도된 멀티머 양성 CD8 T 세포인 세포의 분율을 보여주는 예시적인 결과를 도시한다.

[0529] **실시예 5 - $CD4^+$ T 세포 반응**

[0530] 이전에 확인된 NEO-항원 (PIN)에 대한 $CD4^+$ T 세포 반응은 생체외 유도 프로토콜, 예컨대 상기 기술된 프로토콜 1 또는 2를 사용해 유도될 수 있다. 이러한 실시예에서, $CD4^+$ T 세포 반응은 프로토콜 1을 사용하여 항원 특이적 방식으로 IFNɣ 생성을 모니터링하여 확인하였다. 도 10은 이러한 유세포측정 분석의 대표적인 예를 도시한다. 마지막으로, 야생형이 아닌 돌연변이체 펩티드에 대한 $CD4^+$ T 세포 반응의 특이성은 돌연변이체 또는 야생형 펩티드로 유도된 T 세포 개체군을 자극하여 확인하였다 (도 11).

[0531] **실시예 6 - 미경험 $CD8^+$ T 세포 유도**

[0532] 미경험 $CD8^+$ T 세포 유도는 프로토콜 1 또는 프로토콜 2을 사용한 T 세포 제조이후 유세포측정으로 분석되었다. PBMC 샘플는 인간 공여자 1 또는 인간 공여자 2 유래이고, 전체 PBMC 또는 $CD25^-$ 고갈된 PBMC이다. 세포 샘플은 도 1의 프로토콜에 따라서 단기간 또는 장기간 유도 이후 분석되었다. 유도된 $CD8^+$ T 세포의 미경험 $CD8^+$ 반응은 상이한 펩티드에 대해 분석되었고 도 12-23에 도표화되었다.

[0533] **실시예 7 - $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응**

[0534] 실시예 1의 T 세포 제조 프로토콜은 미경험 구획으로부터 $CD8^+$ T 세포 반응을 유도하기 위해 성공적으로 사용될 수 있다. 도 7은 2회 자극 라운드 이후에 건강한 공여자에서 돌연변이된 에피토프에 대해 생성된 2개 $CD8^+$ T 세포 반응의 대표적인 흐름도를 도시한다. 게다가, 기억 구획으로부터 $CD8^+$ T 세포 반응은 높은 수로 확장될 수

있다. 도 8A에 도시된 대표적인 예에서, 최대 3회 자극 라운드 이후에, 모든 $CD8^+$ T 세포의 대략 50%는 면역 우세 에피토프, CMV pp65, EBV YVL, EBV BMLF1 및 Mart-1에 특이적이었다. 유도된 $CD8^+$ 기억 반응은 펩티드 리콜 어세이에서 다기능성을 입증한다 (탈과립화 및 사이토카인 방출, 도 8B).

[0535] **실시예 8 - T 세포의 유세포측정 분석**

[0536] 도 5A는 프로토콜 2를 사용해 도면에 표시된 조건 하에서 유도된 $CD8^+$ 미경험 T 세포의 ME-1 반응의 예시적인 유세포측정 분석을 도시한다. 도 5B는 도면에 표시된 롱머 유도 하에서 유도된 $CD8^+$ 미경험 T 세포의 ME-1 반응의 유세포측정 분석의 예를 도시한다. $CD8^+$ T 세포의 12.6%는 장기 유도 이후에 ME-1에 특이적인 것으로 관찰되었다.

[0537] **실시예 9 - 유도된 T 세포의 세포독성 어세이**

[0538] 세포독성 어세이는 유도된 T 세포 배양물이 항원 발현 종양주를 사멸시킬 수 있는지 여부를 평가하는데 사용되었다. 이 실시예에서, 생존 및 사멸 종양 세포 상에서 활성 캐스파제 3의 발현을 측정하여 초기 세포 사멸 및 사멸 종양 세포를 정량하였다. 도 9에서, 유도된 $CD8^+$ 기억 반응은 항원 발현 종양 표적을 사멸시킬 수 있었다.

[0539] **실시예 10 - 생성된 $CD8^+$ T 세포의 표현형 분석**

[0540] 표현형 발현을 분석하기 위해서, 각 배양물의 $1x10^4$ 내지 $1x10^6$개의 T 세포를 0.1-10% FBS 및 0.1% 나트륨 아지드를 함유하는 PBS (FBS-PBS)로 세척하였고 형광색소-표지된 항체 (CD45RA 및 CD62L)의 1:100 희석물을 함유하는 FBS-PBS에 재현탁하였다. 얼음 상에서 인큐베이션 후에, 세포를 세척하였고 유세포측정 분석을 위해 고정하였다. 선택된 $CD8^+$ T 세포 배양물이 CD45RA가 아닌, CD62L을 발현하면, 다양한 펩티드에 대한 그들 반응성에 무관하게, 선택된 T 세포 배양물이 $CD8^+$ 기억 T 세포 서브세트에 속한다는 것을 의미할 수 있다.

[0541] **실시예 11 - $CD8^+$ T 세포의 사이토카인 생성**

[0542] $CD8^+$ T 세포 배양물의 사이토카인 프로토콜을 분석할 수 있다. T 세포 배양물은 항원 펩티드가 펄스된 자기유래 APC로 먼저 챌린지될 것이다. 사이토카인 프로파일은 ELISA 키트 (PharMingen, San Diego, Calif.)를 사용해 정량적으로 결정된다. 마이크로타이터 플레이트 (96-웰, NUNC Maxisorp)는 밤새 4℃에서 인간 사이토카인 (IL-4, IL-10, TNF-α, IFN-γ) (PharMingen)에 대한 0.2-4 ㎍/웰의 정제된 마우스 포획 단일클론 항체로 코팅시켰다. 플레이트를 세척하였고 비특이적 결합 부위는 10% (w/v) 태아 소 혈청 (FBS)으로 0.5-3시간 동안 포화될 것이고 이후 세척된다. 상등액 및 사이토카인 표준물은 PBS로 희석될 것이고 중복 웰에 첨가된다. 플레이트는 37℃에서 1-3시간 동안 인큐베이션될 것이고 후속하여 PBS-T로 세척된다. 일치되는 바이오틴화 검출 항체를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1-3시간 동안 인큐베이션된다. 세척 이후에, 아비딘-접합된 홀스래디쉬 퍼옥시다제를 첨가하였고 0.5-3시간 동안 인큐베이션된다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB, Sigma)은 발색을 위해 기질로서 사용되었다. 광학 밀도는 450 nm에서 ELISA 판독기 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)를 사용하여 측정되었고 사이토카인 농도는 이중 8-지점 표준 곡선을 사용해 마이크로플레이트 컴퓨터 소프트웨어 (Bio-Rad)를 통해 정량하였다.

[0543] **실시예 12 - 프로토콜 1 및 프로토콜 2: 요약**

[0544] 이러한 실시예에서, 프로토콜 1 및 프로토콜 2 자극 프로토콜의 결과 요약이 하기 표에 제공된다.

표 1 – 프로토콜 1 및 2 로부터의 결과의 요약

		Prot. 1		Prot. 2			
		$CD14^{고갈}/CD25^{고갈}$		$CD25^{고갈}$		$CD14^{고갈}$ $CD25^{고갈}$	FLT3L x3
		LTS 37	LTS 38	LTS 37	LTS 38	LTS 38	LTS 38
CD8 기억	원액 확장 배수	30-1200	20-5000	20-100	5-100	5-100	5-100
	절대 #	1-50x10^6	20-1000x10^6	0.1-1x10^6	2-10x10^6	2-20x10^6	0.5-10x10^6
	기능성	*stim 3 에서 감소*	*stim 3 에서 감소*	*stim 3 에서 유지*	*stim 3 에서 유지*	*stim 3 에서 유지*	*stim 3 에서 유지*
CD8 미경험	웰 당 히트율	20-40%	0-40%	20-30%	0-20%	10%	0-10%
	펩티드 당 히트율	11 중 1-3	11 중 0-4	11 중 2	11 중 1	11 중 1-3	11 중 1-2
	절대 #	0.1-1x10^6	-	0.01-0.5x10^6	-	-	-
	기능성	TBD*	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
CD4 미경험	히트율/웰	78-100%	56%	10-100%	50%	70%	TBD
	히트율/펩티드	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	절대 #	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	기능성	*양호*	*양호*	*양호*	TBD	TBD	TBD

TBD* = 결정될 것임

[0545]

[0546] **실시예 13 -프로토콜 1 및 2 매개변수 검사**

[0547] 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 예시적인 실험은 소규모로 환자 샘플에서 프로토콜 1을 검사할 수 있다. 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 다른 예의 실험은 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 기능성을 검사하고 단일 세포 RNAseq를 통한 항원 특이적 세포 분류 및 특징규명을 포함하여, 이전 배치에서 생성된 T 세포 생성물을 특징규명할 수 있다. 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 실험의 다른 예는 DC Prep 동안 폴리-ICLC/aCD40L의 첨가를 검사하고 T 세포 농축을 정량할 수 있다. 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 다른 예의 실험은 사멸 어세이에서 항원 특이적 세포독성의 평가, 분화 및 고갈을 측정하기 위해 광범위한 흐름 패널로 펩티드 리콜 어세이의 수행, 및 히트의 서브세트에 대한 감도 (펩티드 적정) 및 특이성 (WT 대 돌연변이체, 풀 디컨볼루션), 및 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포로부터 방관자 효과의 가능성을 제거하기 위해 $CD8^+$ 에 대한 농축을 포함하여, 유도된 $CD8^+$ 미경험 T 세포 반응의 기능성을 검사할 수 있다. 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 다른 예의 실험은 히트의 서브세트에 대해 감도 (펩티드 적정) 및 특이성 (WT 대 돌연변이체, 풀 디컨볼루션)의 결정, 표현형을 더욱 잘 이해하기 위해 분화 및 고갈 흐름 패널로 리콜 어세이를 수행하여, 기능성을 조사할 수 있다. 프로토콜의 매개변수를 검사하기 위한 다른 예의 실험은 상이한 유도의 표현형을 비교하고, 상이한 구획으로부터의 유도의 표현형을 비교하고, 운동학을 조사하는 것을 포함하여, 단일 세포 RNAseq를 통해서 항원 특이적 T 세포 ($CD8^+$ 기억, $CD8^+$ 미경험, $CD4^+$ 미경험)를 분류하고 프로파일링할 수 있다.

[0548] **실시예 14 - CD14 및/또는 CD25 발현 세포가 고갈된 T 세포 투입물은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 미경험 T 세포의 유도를 개선시킨다**

[0549] 하기 표 2는 $CD14^-/CD25^-$ 고갈이 $CD8^+$ 미경험 히트율을 증가시키고 일관된 $CD4^+$ 히트율을 갖는다는 것을 입증하는 프로토콜 1 T 세포 제조 방법의 결과를 도시한다.

표 2 - $CD14^-/CD25^-$ 고갈 결과

LTS#33		CD14⁻	CD25⁻	CD14⁻/CD25⁻
CD8 미경험 히트율 %	HD34	20	30	50
	HD35	0	0	10
	평균	10	15	30
CD4 미경험 히트율 %	HD34	100	80	90
	HD35	100	100	100
	평균	100	90	95

[0550]

[0551] **실시예 15 - $CD8^+$ 미경험 유도는 프로토콜 2의 사용으로 유의하게 개선되었다**

[0552] 하기 표 3A 및 3B는 본 명세서에 기술된 프로토콜 1 및 프로토콜 2 둘 모두의 T 세포 제조 방법의 결과를 표시한다. 검사된 2명 인간 공여자에서, $CD8^+$ 미경험 유도는 CD14 발현 세포의 고갈을 사용하는 것과 비교하여 CD25 발현 세포의 고갈 또는 CD25 및 CD14 발현 세포의 고갈을 사용하여 유의하게 개선되었다. $CD8^+$ 미경험 유도는 또한 FLT3L 자극을 사용해 유의하게 개선되었다.

표 3A – HD35 로부터의 $CD8^+$ 미경험 유도 결과

	HD35	Prot. 1 (CD25 고갈) 1/13 확인됨 7.5% 성공율				Prot. 2 (원액) 3/13 확인됨 23% 성공율				Prot. 2 (CD25 고갈) 5/13 확인됨 39% 성공율			
		19일		26일		19일		26일		19일		26일	
		초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인
단핵구 유도	HIV 복제물 1												
	HIV 복제물 2												
	HIV 복제물 3												
	HIV 복제물 4											HIV-3 0.226%	HIV-3 0.0203%
	HIV 복제물 5	HIV-5 * 0.0327%	HIV-5 * 0.0691%	HIV-5	HIV-5	HIV-3 0.496%	HIV-3 0.215%	HIV-3 0.33%	HIV-3 0.0722%				
	PIN 복제물 1												
	PIN 복제물 2					CSNK1A1 0.135%	CSNK1A1 0.0747%	CSNK1A1 0.219%	CSNK1A1 0.193%				
	PIN 복제물 3												
	PIN 복제물 4					ME-1 4.15%	ME-1 0.927%	ME-1 12.6%	ME-1 2.34%	GAS7/ACTN4 0.012/0.284%	GAS7/ACTN4 0.076/0.156%	GAS7/ACTN4 0.241/0.376%	GAS7/ACTN4 0.669/0.095%
	PIN 복제물 5									ACTN4 0.101%	ACTN4 0.032%		
장형	PIN LONG 복제물 1									CSNK1A1 0.0342%	CSNK1A1 0.0482%	CSNK1A1 0.0156%	CSNK1A1 0.0265%

[0553]

	PIN LONG 복제물 2											
	PIN LONG 복제물 3											

[0554]

표 3B - HD34 으로부터의 CD8+ 미경험 유도 결과

	HD34	Prot. 1 0/13 확인됨 0% 성공율				Prot. 2 원액 투입 2/13 확인됨 15% 성공율				Prot. 2 CD25 고갈 투입 2/13 확인됨 15% 성공율			
		19 일		26 일		19 일		26 일		19 일		26 일	
		초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인	초기	확인
단백질 유도 펩티드	HIV 복제물 1									HIV-5 0.358%	HIV-5 0.789%	HIV-5 1.93%	HIV-5 3.61%
	HIV 복제물 2					HIV-3 HIV-5 0.017/0.098%	HIV-3 && HIV-5 0.013/0.279%	HIV-5 0.056%	HIV-5 0.173%				
	HIV 복제물 3												
	HIV 복제물 4												
	HIV 복제물 5												
	PIN 복제물 1									PRDX5 0.33%	PRDX5 0.119%	PRDX5 1.58%	PRDX5 0.549%
	PIN 복제물 2												
	PIN 복제물 3												
	PIN 복제물 4												
	PIN 복제물 5												

[0555]

[0556] **실시예 16 - pMHC 특이적 시약에 대한 UV 매개 펩티드 교환 어세이.**

[0557] 항원 특이적 pMHC 멀티머는 HLA 특이적 단량체의 UV 매개 펩티드 교환 및 후속 다량체화를 통해 생성된다. 이들은 항원 특이적 T 세포를 검출하는데 사용되었다.

[0558] 조건적 리간드의 UV-매개 절단은 시간 의존적일 수 있다. 하기 기술된 설정을 사용하여, 펩티드 절단은 1분 이후에 검출될 수 있고 대략 15분 이후에 본질적으로 완료될 수 있다. 30분 내지 60분 인큐베이션 시간이 보통 사용되어서 관심 펩티드로 조건적 리간드의 최적 교환을 보장할 수 있다. 단백질 농도는 니트로페닐 모이어티 및 반응 생성물 둘 모두가 장파장 UV광을 흡수하므로, UV-매개 절단 속도에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 경로 길이는 반응 속도에 영향을 미칠 수 있다. UV 노출 시 형성되는 빈, 펩티드 수용성 MHC 분자는 관심 MHC 리간드의 존재 하에서 UV-매개 절단을 수행해 구제될 수 있다. 대부분의 실험에서, MHC에 대해 100배 몰 과량의 펩티드가 사용된다. UV 유도된 펩티드 교환은 통상적으로 25 μg/mL의 UV 감광성 MHC 클래스 I 복합체를 사용해 수행된다. 그러나, 펩티드 교환 반응은 최대 100-200 μg/mL 농도의 MHC 클래스 I 농도로 수행될 수 있다.

[0559] ***재료:***

[0560] 96-웰 플레이트 (cat. #: 651201 폴리프로필렌 마이크로플레이트 96웰, V sharp, Greiner Bio-one)

[0561] UV 램프 장파 UV 구비된 UV-램프 366 nm CAMAG UV 캐비넷 3 (카탈로그 #: 022.9070, CAMAG), 366 nm, 2 x 8 W (cat. #: 022.9115, CAMAG) 또는 Uvitec tube light, 2 x 15W, 365 nm blacklight blue 튜브 구비 (모델-LI215BLB 크기 L x W x H 505 x 140 x117 mm)

[0562] 마이크로타이터 플레이트용 로터 구비된 원심분리기.

[0563] ***절차:***

[0564] 1. 96-웰 플레이트에 표 4에 표시된 바와 같이 각 웰에 하기 시약을 첨가한다:

표 4

시약	양	최종 농도
PBS	100 μL	적용불가
10x 교환 펩티드 (PBS 중 500 μM)	12.5 μL	50 μM
10x UV-감광성 MHC 클래스 I 분자 (250 μg/mL; ~5 μM)	12.5 μL	25 μg/mL (약 0.5 μM)

[0565]

[0566] 2. 96-웰 플레이트를 UV 램프 (366nm) 하에서 1시간 동안 두고, UV 램프와 샘플 간 거리는 대략 5 cm이다.

[0567] 3. 플레이트를 3,300g에서 5분 동안 스핀한다. 상등액의 100 ㎕ (임의 펠렛의 전달을 피하기 위해 플레이트를 일정 각도로 유지함)를 후속 적용을 위해 새로운 96-웰 플레이트로 옮긴다.

[0568] **실시예 17 - 형광색소 접합된 pMHC 멀티머 조립**

[0569] MHC 클래스 I 복합체는 형광단-표지된 스트렙타비딘과 복합체형성하여 T 세포 분석을 위한 MHC 클래스 I 사량체를 형성할 수 있다. 일반적으로 사용되는 형광단은 알로파이코시아닌 및 파이코에리쓰린을 포함하고, 이들 접합체와 MHC 멀티머의 형성은 하기에 기술된다. 그러나, 스트렙타비딘-코팅된 퀀텀 도트 또는 임의의 스트렙타비딘-커플링된 형광단은 T 세포 검출을 위한 MHC 멀티머를 제조하는데 사용될 수도 있다.

[0570] ***재료:***

[0571] PE-스트렙타비딘 용액 1 mg/mL (cat. #: S866, Molecular Probes) 또는 APC 스트렙타비딘 용액 1 mg/mL (cat. #: S868, Molecular Probes)

[0572] 100 ㎕/웰 중 25 ㎍/mL의 pMHC를 함유하는, 교환된 MHC 클래스 I 복합체 존재의 마이크로타이터 플레이트. 이것은 웰 당 2.5 ㎍ 또는 0.05 nmol MHC 클래스 I에 상응한다.

[0573] ***절차:***

[0574] 1. PBS 중 27 ㎍/mL의 스트렙타비딘-PE, 또는 PBS 중 14.6 ㎍/mL의 스트렙타비딘-APC의 희석물을 생성시켜서, 각 웰 당 100 ㎕의 MHC 클래스 I을 제조한다.

[0575] 2. 10분 간격으로 25 ㎕의 4회 순차적 첨가를 통해서 스트렙타비딘-PE 또는 -APC를 MHC 클래스 I에 첨가한다.

[0576] **실시예 18 - MHC 멀티머의 조합적 코딩**

[0577] *UV-매개 MHC 펩티드 교환*

[0578] 1. 바이오틴화된 p*MHC 복합체의 스톡 용액을 얼음 상에서 해동한다.

[0579] 2. 관심의 바이오틴화된 p*MHC 복합체를 PBS 중에 200 ㎍/mL 까지 희석한다. 60 ㎕의 부피가 교환 반응 당 필요하다. Qdot585에 접합시키려는 pMHC 복합체 경우에, 80 ㎕가 교환 반응 당 필요하다.

[0580] 3. 펩티드 스톡을 400 μM까지 PBS에 희석한다. 펩티드 당 최소 70 ㎕를 제조하고, Qdot585에 접합시키려는 pMHC 복합체를 만드는데 사용되는 펩티드 경우에, 펩티드 당 최소 90 ㎕를 제조한다.

[0581] 4. V-바닥의 96-웰 폴리프로필렌 마이크로플레이트에서, 웰 당 60 ㎕의 200 ㎍/mL 선택 대립유전자의 p*MHC 및 60 ㎕의 400 μM 펩티드 용액을 혼합한다 (최종 농도: 100 ㎍/mL p*MHC 및 200 μM 펩티드). Qdot585에 접합시키려는 pMHC 복합체 경우, 80 ㎕의 200 ㎍/mL p*MHC 및 80 ㎕의 400 μM 펩티드 용액을 혼합한다.

[0582] 5. 96-웰 마이크로플레이트를 UV 광 (~366 nm)에 1시간 동안 RT에서 노출시킨다. UV 램프까지 거리는 2-5 cm 여야 한다.

[0583] 6. 플레이트를 3,300g에서 5분 동안 RT에서 원심분리한다.

[0584] 7. 멈춤 지점이 포함되었으면 단계 6을 반복하고, 2 X 50 ㎕의 상등액을 2개의 새로운 V-바닥 96-웰 폴리프로

필렌 마이크로플레이트로 옮기고 얼음 상에 유지시킨다. Qdot585에 접합시키려는 pMHC 복합체 경우에, 2 X 70 ㎕를 옮긴다. 응집체의 전달은 잠재적으로 최종 MHC 멀티머 염색의 배경값을 증가시키게 되므로, 바닥 펠렛 (종종 보이지 않음)을 옮기지 않도록 주의한다.

[0585] 8. 형광색소-스트렙타비딘 접합체에 접합을 통해 pHMC 단량체를 다량체화시킨다. 하기에 차등 접합이 기술된다. Qdot605-, 625-, 655- 또는 705-스트렙타비딘에 접합을 위한 선택안 A; Qdot585-스트렙타비딘에 접합을 위한 선택안 B; 및 PE-, APC- 또는 PE-Cy7-스트렙타비딘에 접합을 위한 선택안 C.

[0586] (A) Qdot605-, 625-, 655- 또는 705-스트렙타비딘에 접합: (i) 50 ㎕의 pMHC 단량체 당 3.5 ㎕의 Qdot-스트렙타비딘 접합체 (스톡 농도 1 μM)를 첨가한다 (66 nM의 최종 농도까지).

[0587] (B) Qdot585-스트렙타비딘에 접합: (i) 70 ㎕의 pMHC 단량체 당 4.9 ㎕의 Qdot585-스트렙타비딘 접합체 (스톡 농도 1 μM)를 첨가한다 (66 nM의 최종 농도까지).

[0588] (C) PE-, APC- 또는 PE-Cy7-스트렙타비딘에 접합: (i) 50 ㎕의 pMHC 단량체 당 4.6 ㎕의 PE-, APC- 또는 PE-Cy7-스트렙타비딘 접합체 (스톡 농도 200 ㎍/mL)를 첨가한다 (16.8 ㎍/mL의 최종 농도까지).

[0589] 9. 충분히 혼합하고 접합되도록 30분 동안 얼음 상에 정치시킨다.

[0590] 10. D-바이오틴 및 NaN_3을 25 μM D-바이오틴 및 0.02% (wt/vol) NaN_3의 최종 농도까지 첨가한다. 이것은 2.5 ㎕의 20배 스톡 용액 (500 μM D-바이오틴과 0.4% (wt/vol) NaN_3)을 각 웰에 첨가하여 수행하고; Qdot585에 접합된 MHC 멀티머 경우에, 3.5 ㎕를 각 웰에 첨가한다. 충분히 혼합하고 얼음 상에서 20분 동안 인큐베이션시킨다.

[0591] 11. 25 μM D-바이오틴 및 0.02% (wt/vol) NaN_3를 함유하는 50 ㎕의 PBS를 PE, APC 또는 PE-Cy7에 접합된 MHC 멀티머에 첨가한다 (2배 희석).

[0592] 12. 상이한 복합체를 혼합한다. 혼합될 때, Qdot585 대 모든 다른 색상 복합체의 2:1 비율을 사용한다. 모든 다른 색상 복합체를 1:1 비율로 혼합한다.

[0593] ***MHC 멀티머로 T 세포 염색***

[0594] 13. 모든 27 색상 조합에 대한 MHC 멀티머를 혼합하여 하나의 사용 준비된 샘플을 수득하고 이것을 3,300g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하고 상등액을 옮긴다. 전체로, 54 ㎕의 상등액은 각 T 세포 염색에 요구될 것이다 (즉, 혼합물에 존재하는 각각의 개별 pMHC 복합체에 대해 2 ㎕).

[0595] 14. PBMC 샘플 (또는 다른 관련 T 세포 샘플)을 해동하고 그들을 2회 RPMI로 세척한다. 이것은 세포의 응괴를 감소시키도록 해동 시 DNase를 처치하는 것을 권고한다 (예를 들어, 0.025 mg/mL 풀모자임 및 2.5 mM $MgCl_2$을 함유하는 배지에서 세포 해동에 의함).

[0596] 15. 2% (vol/vol) FBS (FACS 완충제) 존재의 PBS 중에서 세포를 재현탁하고 그들을 96-웰 폴리스티렌 U-바닥 마이크로플레이트에, 200 ㎕의 FACS 완충제 중 웰 당 최대 $3x10^6$ 세포를 분포시킨다.

[0597] 16. 플레이트를 490g에서 5분 동안 RT에서 스핀한다.

[0598] 17. 플레이트를 위 아래로 팁핑하여 완충액을 버리고, 세포는 웰 바닥에 펠렛으로 남겨진다.

[0599] 18. 54 ㎕의 단계 13의 MHC 멀티머를 첨가하고 충분히 혼합한다.

[0600] 19. 15분 동안 37℃에서 인큐베이션시킨다.

[0601] 20. 플레이트를 얼음 상으로 옮기고 5X 스톡으로부터 20 ㎕의 항체 혼합물을 첨가한다.

[0602] 21. 근-IR 사멸 세포 염색물의 40배 희석물의 4 ㎕를 첨가하고 충분히 혼합한다.

[0603] 22. 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시킨다.

[0604] 23. 플레이트를 490g에서 5분 동안 4℃에서 스핀한다.

[0605] 24. 플레이트를 위 아래로 팁핑하여 상등액을 버린다.

[0606] 25. 200 ㎕의 FACS 완충제 (2회 490g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하고 각 스핀 후에 플레이트를 위 아래로

팁핑하여 상등액을 제거함)으로 2회 세척한다.

[0607] 26. 펠렛을 50-100 ㎕의 FACS 완충제 중에 현탁시키고 이것을 1.4 mL 또는 5 mL FACS 튜브로 옮긴다. 샘플은 이제 유세포측정기 상에서 획득을 위해 준비된다.

[0608] ***단일 색상 보정 대조군***

[0609] 27. 100 ㎕의 FACS 완충제 및 1액적의 음성 보정 비드를 11 FACS 튜브 (번호 1-11)에 첨가한다.

[0610] 28. 항-마우스 Ig-κ 보정 비드의 1 액적을 단계 27의 튜브 1-10에 첨가하고 ArC 아민 반응성 비드의 1 액적을 새로운 튜브 (번호 12)에 첨가한다.

[0611] 29. 5 ㎕의 1 mg/mL 항-CD8-바이오틴을 튜브 1-8에 첨가하고 혼합한다.

[0612] 30. 튜브 1-8을 20분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시킨다.

[0613] 31. 튜브 1-8을 2회 2 mL의 FACS 완충제 (490g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리함)로 세척한다.

[0614] 32. 1 ㎕의 근-IR 사멸 세포 염색물을 튜브 12 (단계 28 유래)에 첨가하고; 혼합하고 30분 동안 RT에 암실에서 인큐베이션한다.

[0615] 33. 스트렙타비딘-형광색소 접합체를 10배 희석하고 (Qdot585 제회), 각각의 5 ㎕를 튜브 1-7에 첨가하고, 1 ㎕의 미희석된 Qdot585-스트렙타비딘을 튜브 8에 첨가하고 나서, 20분 동안 얼음 상에 암실에서 인큐베이션시킨다.

[0616] 34. 5 ㎕의 FITC 항체 (덤프 채널 항체 중 하나 사용) 또는 5 ㎕의 Alexa Fluor 700 항-CD8a 항체를 튜브 9 및 10 (단계 28 유래)에 첨가하고; 20분 동안 얼음 상에 암실에서 인큐베이션시킨다.

[0617] 35. 튜브 1-11을 2회 2 mL의 FACS 완충제로 세척하고, 튜브 12를 2회 2 mL의 PBS로 세척한다 (490g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리함).

[0618] 36. 모든 튜브를 150 ㎕의 FACS 완충제에 재현탁한다. ArC-음성 비드의 1 액적을 튜브 12에 첨가하고 혼합한다. 보정 대조군은 유세포측정기 상에서 획득을 위해 준비된다.

[0619] ***게이팅 전략***

[0620] 37. 먼저 림프구 상에서, 후속하여 단일 세포 (FSC-α, FSC-W), 생 세포, 덤프 채널-음성 세포 및 $CD8^+$ 세포 상에서 게이팅한다.

[0621] 38. 8개 상이한 MHC 멀티머 채널에서 양성 사건을 정의하는 별도 게이트를 작성한다.

[0622] 39. 8개 MHC-양성 게이트를 반전시켜서, $CD8^+$ 및 MHC 멀티머-음성 세포를 각각의 MHC 멀티머 채널에 대해 선택하여 8개 게이트를 수득한다.

[0623] 40. 다른 6개 MHC 멀티머 개체군의 각각에 대해 반전된 게이트로 2개 MHC 멀티머-양성 개체군에 대한 게이트를 교차시킨다. 게이트의 이러한 조합은 2개 및 오직 2개 MHC 멀티머 채널에서 양성인 $CD8^+$ 세포에 대해 선택된다 (즉, 세포가 하나 또는 셋 이상의 MHC 멀티머 채널에서 양성이면, 게이트 아웃됨). 이러한 게이트의 예는 PE^+ 및 APC^+ 및 $PE\text{-}Cy7^-$ 및 $Qdot585^-$ 및 $Qdot605^-$ 및 $Qdot625^-$ 및 $Qdot655^-$ 및 $Qdot705^-$ 이다.

[0624] 41. MHC 멀티머의 모든 28개의 가능한 2-색 조합에 대해 이들 교차된 게이트 (단계 40에 기술)를 만든다.

[0625] 42. 단계 41로부터 모든 28개 게이트를 연결한다 (예를 들어, 게이트 1 또는 게이트 2 또는...또는 게이트 28).

[0626] 43. 단계 39로부터 8개 반전 게이트를 교차한다 (PE^- 및 APC^- 및 $PE\text{-}Cy7^-$ 및 $Qdot585^-$ 및 $Qdot605^-$ 및 $Qdot625^-$ 및 $Qdot655^-$ 및 $Qdot705^-$).

[0627] 44. 단계 42 및 43으로부터 2개 게이트를 연결한다.

[0628] 45. 단계 44에 대해 게이팅된 사건을 보여주는, 모든 가능한 2-색 코드로 28 도트 그래프를 만든다. 이들 그래프는 모든 MHC 멀티머에 대해 음성이거나 또는 2개에 대해 양성인 $CD8^+$ 세포만을 도시할 것이고; 모든 배경 사

건은 게이트 아웃된다.

[0629] 46. 또한 모든 $CD8^+$ 세포를 보여주는 모든 가능한 2-색 코드로 28 도트 그래프를 만든다. 이들 그래프는 샘플 중 배경 수준의 양호한 지시를 제공할 것이고 또한 부적절한 보정을 밝히는데 사용될 수 있다. 배경치에서 반응을 분리하는 경험을 획득하기 위해서 게이팅된 그래프와 이들 '비게이팅된' 그래프를 비교하는 것을 추천한다. 이것은 저-강도 개체군의 경우에 특히 중요할 수 있다.

[0630] **실시예 19 - 형광성 세포 바코드화**

[0631] 세포 바코드화는 유세포측정을 통해 다중복합 표현형 및 기능 분석을 수행하는데 사용될 수 있다. 이들 포스포 흐름은 FCB 표지화를 포함하도록 약간의 변형으로 수행될 수 있다. 포름알데히드 고정 이후에, 샘플은 표시된 농도의 Alexa Fluor 또는 Pacific Blue 숙신이미딜 에스테르를 함유하는 100% 20-25℃ 메탄올 (전형적으로 10^6 세포 당 500 ㎕)에 재현탁될 것이고, 각각의 샘플은 상이한 농도의 형광 염료를 받는다. 일부 경우에, 샘플은 메탄올 중에 재현탁될 수 있고 이어서 DMSO에 용해된 FCB 형광단 (전형적으로 1:50 희석)이 첨가될 것이다. 이것은 96웰 플레이트 실험에 필요한, DMSO 중 FCB 염색 매트릭스의 사전 제조 및 저장을 허용하도록 수행될 수 있다. 15분 동안 20-25℃에서 표지화 후, 세포는 염색 매질 (0.5% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 함유하는 포스페이트 완충 염수 (pH 7.0))로 2회 세척된다. 4℃ 이하에서 표지화는 매우 낮은 표지화 강도를 생성할 수 있어서, FCB 염색 수준 증가없이 메탄올 염색 용액 중에 -80℃에서 샘플의 저장을 허용한다.

[0632] 차등적으로 표지된 샘플은 하나의 FACS 튜브 또는 웰에 배합될 것이고, 최종 부피가 100 ㎕를 초과하면 다시 펠렛화시킨다. 배합된, 바코드화된 샘플 (전형적으로 100 ㎕)은 포스포-특이적 및/또는 표면 마커 항체로 염색되고, 세척되고, 유세포측정으로 분석된다. 유세포측정은 405 nm, 488 nm 및 633 nm 레이저, 및 제조사 스톡 필터가 장착된, BD LSR 유세포측정기 상에서 수행되며, 캐스캐이드 옐로우에 대한 405 nm 옥타곤 통과대역 필터는 퀀텀 도트 605의 검출을 위한 610/20 통과대역 필터를 갖는 캐스캐이드 옐로우로 교체된다.

[0633] **실시예 20 - $CD4^+$ 미경험 유도**

[0634] 프로토콜 1 및 2는 PIN 펩티드를 사용해 수행되었다. 항원 특이적 $CD4^+$ 미경험 유도를 평가하였다. 결과는 하기 표 5에서 확인할 수 있다. 'Y'는 T 세포 반응이 관찰되었다는 것을 의미한다.

표 5 – 공여자 1 및 2 로부터의 $CD4^+$ 미경험 유도 결과

장기간 유도 판독		공여자 2			공여자 1		
LTS#35		Prot. 1 ($CD25^-$)	Prot. 2 전체 PBMC	Prot. 2 $CD25^-$	Prot. 1 ($CD25^-$)	Prot. 2 전체 PBMC	Prot. 2 $CD25^-$
장형 펩티드로 유도	PIN 복제물 1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	PIN 복제물 2	Y	Y	Y	Y	-	-
	PIN 복제물 3	-	Y	Y	Y	Y	-
결과		2/3 66%	3/3 100%	3/3 100%	3/3 100%	2/3 66%	1/3 33%

[0635]

[0636] **실시예 21 - 제조 과정: DC 유도체화**

표 6 - DC 유도화를 위해 후속되는 예시적인 프로토콜

단계 1	단핵구 농축 및 DC 배양	자기유래 세포 성분채집 봉투 #1
단계 2		단핵구 농축
단계 3		DC 배양
단계 4	펩티드 로딩 및 DC 성숙화	DC 수확, DC 배지에 재현탁
단계 5		환자 특이적 펩티드 첨가 및 인큐베이션
단계 6		DC 성숙화

[0637]

[0638] 실시예 22 - T 세포 유도 프로토콜 1

표 7A - T 세포 유도 #1

단계 7	자기유래 세포 성분채집 봉투 #2
단계 8	$CD25^+$ 고갈 ($^+$/- $CD14^+$ 고갈)
단계 9	DC 세척 및 T 세포 배양 배지에 재현탁
단계 10	T 세포와 성숙 DC (DC 유도화에 의함)의 인큐베이션

표 7B - T 세포 유도 #2

단계 11	T 세포 세척 및 T 세포 배지에 재현탁
단계 12	T 세포와 성숙 DC (DC 유도화에 의함)의 인큐베이션

표 7C -T 세포 유도 #3

단계 11	T 세포 세척 및 T 세포 배지에 재현탁
단계 12	T 세포와 성숙 DC (DC 유도화에 의함)의 인큐베이션

표 7D – 수확 및 저온저장

단계 15		T 세포 수확	출시 검사: 마이코플라스마
단계 16	**약물 물질**	세척 및 최종 제제에 현탁	출시 검사: 무균성, 내독소, 세포 표현형, TNC 계측, 생존능, 세포 농축
단계 17	**약물 제품**	DS 충전 및 저온 저장 액체 질소의 증기상에 저장	

[0639]

[0640] 실시예 23 - T 세포 유도 프로토콜 2

표 8A - T 세포 유도 #1

단계 7	자기유래 세포 성분채집 봉투 #2
단계 8	$CD25^+$ 고갈 ($^+$/- $CD14^+$ 고갈)
단계 8a	FLT3L 첨가
단계 9	환자 특이적 펩티드 첨가 및 인큐베이션
단계 10	고갈된 PMBC 와 FLT3L 및 펩티드의 인큐베이션

표 8B - T 세포 유도 #2

단계 11	T 세포 세척 T 세포 배지에 재현탁
단계 12	T 세포와 성숙 DC (DC 유도화에 의함)의 인큐베이션

표 8C - T 세포 유도 #3

단계 11	T 세포 세척 T 세포 배지에 재현탁
단계 12	T 세포와 성숙 DC (DC 유도화에 의함)의 인큐베이션

[0641]

표 9 – 수확 및 저온저장

단계 15		T 세포 수확	출시 검사: 마이코플라스마
단계 16	**약물 물질**	세척 및 최종 제제에 현탁	출시 검사: 무균성, 내독소, 세포 표현형, TNC 계측, 생존능, 세포 농축
단계 17	**약물 제품**	약물 물질 충전 및 저온저장 액체 질소의 증기상에 저장	

[0642]

[0643] 실시예 24 - 다중복합, 다중매개변수 유세포측정을 사용한 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 네오항원-특이적 T 세포 반응의 동시 검출 및 기능적 특징규명

[0644] 단백질-코딩 유전자 서열을 변경시키는 체세포 돌연변이로부터 암 세포에서 발생된, 네오항원은 면역요법을 위한 매력적인 표적으로서 출현된다. 그들은 건강한 조직과 반대로 종양 세포에서 고유하게 발현되고 면역계에 의해 외래 항원으로서 인식되어, 면역원성을 증가시킬 수 있다. T 세포 제조 과정은 다수 라운드의 생체외 T 세포 자극을 통해서 환자-특이적 네오항원에 대한 기억 및 신생 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 반응을 상승시키도록 개발되어서, 양자 세포 요법에 사용을 위한 네오항원-반응성 T 세포 생성물을 생성시킨다. 자극된 T 세포 생성물의 상세한 특징규명은 이들 과정이 이용하는 많은 잠재적 변수를 검사하는데 사용될 수 있다.

[0645] T 세포 기능성 및/또는 특이성을 증명하기 위해서, 어세이는 동시에 항원-특이적 T 세포 반응을 검출하고 그들 규모 및 기능을 특징규명하기 위해 개발되었다. 이러한 어세이는 다음 단계를 적용하였다. 첫번째 T 세포-APC 공-배양을 사용하여 항원-특이적 T 세포에서 반응성을 유발시켰다. 임의로, 형광 세포 바코드화를 사용한 샘플 다중복합화가 적용되었다. 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포를 확인하고 T 세포 기능성을 조사하기 위해서, 펩티드-MHC 멀티머의 염색 및 다중매개변수 세포내 및/또는 세포 표면 세포 마커 염색은 FACS 분석을 사용하여 동시에 증명되었다. 이러한 능률적인 어세이의 결과는 건강한 공여자로부터 유도된 T 세포 반응을 연구하기 위해 이의 적용을 입증하였다. 펩티드에 대해 유도된 네오항원-특이적 T 세포 반응은 건강한 공여자에서 확인되었다. 유도된 T 세포 반응의 규모, 특이성 및 기능성이 또한 비교되었다. 도 25 및 도26은 T 세포 샘플의 MHC 사량체 염색 및 세포 마커 프로파일의 동시 분석을 위한 예시적인 과정이 도시된다.

[0646] 간략하게, 상이한 T 세포 샘플은 상이한 농도에서 상이한 형광 염료로 바코드화되었다 (예를 들어, 실시예 19 참조). 각각의 샘플은 상이한 농도의 형광 염료 또는 상이한 농도의 다수 염료의 조합을 받았다. 샘플은 포스페이트-완충 염수 (PBS)에 재현탁되었고 다음으로 DMSO에 용해된 형광단 (전형적으로 1:50 희석)은 5 μM의 최대 최종 농도로 첨가되었다. 5분 동안 37℃에서 표지화 후에, 과량의 형광 염료는 단백질-함유 배지 (예를 들어, 10% 풀링된 인간 AB형 혈청 함유 RPMI 배지)의 첨가로 소광되었다. 고유하게 바코드화된 T 세포 배양물은 상기 기술된 바와 같은 항원 펩티드로 펄스된 자기유래 APC로 챌린지되었다.

[0647] 차등적으로 표지된 샘플은 하나의 FACS 튜브 또는 웰에 배합되고, 최종 부피가 100 ㎕를 초과하면 다시 펠렛화하였다. 배합된, 바코드화된 샘플 (전형적으로 100 ㎕)은 LAMP-1을 포함하는 표면 마커 항체로 염색되었고 (예를 들어, 실시예 11 참조) 조립된 형광색소 접합된 펩티드-MHC 멀티머와 인큐베이션되었다 (예를 들어, 상기 실시예 17 및 18 참조). 고정 및 투과 이후에, 샘플은 추가로 TNF-α 및 IFN-γ를 표적화하는 항체로 세포내에서 염색되었다.

[0648] 배합된, 바코드화 T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색은 이후에 유세포측정기 상에서 유세포측정으로 동시에 분석되었다. T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색을 별도로 분석하는 다른 방법과 달리, 본 실시예에 기술된 T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색의 동시 분석은 항원 특이적이고 증가된 세포 마커 염색을 갖는 T 세포의 백분율에 대한 정보를 제공한다. T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색을 분석하는 다른 방법은 별도로 항원 특이적인 샘플의 T 세포의 백분율을 결정하고, 별도로 증가된 세포 마커 염색을 갖는 T 세포의 백분율을 결정하여서, 이들 빈도의 상관성만을 허용한다. 이 실시예에 기술된 T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색의 동시 분석은 항원 특이적 T 세포의 빈도 및 증가된 세포 마커 염색을 갖는 T 세포의 빈도의 상관성에 의존하지 않고; 대신에 항원 특이적이고 증가된 세포 마커 염색을 갖는 T 세포의 빈도를 제공한다. 이 실시예에 기술된 T 세포 샘플의 세포 마커 프로파일 및 MHC 사량체 염색의 동시 분석은 항원 특이적이고 증가된 세포 마커 염색을 갖는 세포들을, 단일 세포 수준에서 결정하도록 허용한다.

[0649] 소정 유도 과정의 성공을 평가하기 위해서, 리콜 반응 어세이를 사용하고 나서, 다중화, 다중매개변수 유세포측정 패널 분석을 후속하였다. 유도 배양물로부터 채취된 샘플은 고유한 2-색 형광 세포 바코드로 표시되었다. 표지된 세포는 항원-로딩된 DC 또는 비로딩된 DC 상에서 밤새 인큐베이션되어서 항원-특이적 세포에서 기능적 반응을 자극하였다. 다음 날에, 고유하게 표지된 세포는 하기 표 10에 따라서 항체 및 멀티머 염색 전에 배합되었다.

표 10 – 어세이 표적 (마커), 형광색소 및 목적

마커	형광색소	목적
CD19/CD16/CD14	BUV395	세포 배제
생/사멸	근-IR	사멸 세포 배제
CD3	BUV805	계통 게이팅
CD4	Alexa Fluor 700	계통 게이팅
CD8	PerCP-Cy5.5	계통 게이팅
바코드 1	CFSE	샘플 다중복합화
바코드 2	TagIT Violet	샘플 다중복합화
멀티머 1	PE	CD8+ 항원 특이성
멀티머 2	BV650	CD8+ 항원 특이성
IFNγ	APC	기능성
TNFα	BV711	기능성
CD107a	BV786	세포독성
4-1BB	PE/Dazzle 594	활성화

[0650]

[0651] 별도로 또는 혼합물로서 수득된, 표지화에 의한 다중복합 샘플을 완전해 디컨볼루션시키는 능력을 결정하였다 (도 27A). 고유하게 표지된 샘플은 최소 내지 전무한 교차-오염으로 다른 바코드로 완전하게 분해될 수 있었다. 멀티머 염색에 의한 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포의 검출은 샘플 다중복합화로 유지되었다. CMV pp65, EBV BRLF1, EBV BMLF1 및/또는 MART-1에 대한 특이성을 갖는 ~20%의 $CD8^+$ T 세포를 함유하는 유도 배양물의 샘플을 분할하였고, 9개의 고유한 2-색 바코드로 표지화하고나서, 염색을 위해 동일한 2색 조합 (브릴리언트 바이올렛 650 [BV650] 및 파이코에리쓰린 [PE])에서 모든 4개 특이성을 표적화하는 사량체와 배합하였다 (도 27B). 모든 9개 바코드는 비슷한 사량체 염색 패턴을 산출하였고 사량체$^+$ 세포의 빈도를 검출하였다.

[0652] 신생 $CD4^+$ T-세포 반응물을 함유하는 2개의 유도된 배양물의 샘플을 또한 바코드화없이 단독으로 또는 미관련 샘플과 혼합하여, 리콜 반응 어세이에서 분석하였다 (도 28A 및 도 28B). 세포로부터 유발된 반응의 규모 및 기능의 수는 샘플 바코드화로 인해 유의하게 변화되지 않았다.

[0653] 유도된 CD8+ 기억 반응의 특이성 및 기능성의 동시 분석은 CMV pp65, MART-1 및 EBV BRLF1 및 BMLF1 에피토프에 대한 $CD8^+$ 기억 반응이 출발한 건강한 공여자 물질에서 0.23%의 $CD8^+$ T 세포로부터 > 60% 까지 상승할 수 있었음을 입증하였다 (도 29A)

[0654] $CD8^+$ 멀티머$^+$ 세포에서 사전-게이팅에 의해서, 항원-특이적 T 세포의 기능은 선택적으로 조사되었다 (도 29B). 세포는 항원-로딩된 DC에 노출 시에 세포독성 기능 (CD107a 표면 노출) 및 IFNγ 분비를 나타내었다.

[0655] 동일 배양물 중 다수 특이성을 갖는 신생 유도된 $CD4^+$ 반응의 검출 및 기능적 특징규명을 또한 입증하였다. 항원-특이적 기능성은 유도된 $CD4^+$ T-세포 반응을 확인하는데 이용되었다 (도 30A). 표시된 실시예에서, 유도는 HIV-음성 건강 공여자에서의 미경험 표적인, 10 HIV-유래 에피토프를 표적화하는 4개 복제 배양물에서 수행되었다. 항원-특이적 반응은 모든 4개 생물학적 복제물에서 검출되었다. 검출된 반응 중 3개는 유도된 반응의 특이성을 확인하기 위해 풀 디컨볼루션을 통해 추가 추적 검사를 위해 선택되었다 (도 30B). 다수 반응이 검사된 각 복제물에서 검출되었고, 동일한 2종 에피토프 (HIV #5 및 HIV #7)는 각 경우에 최고 규모 반응을 유도하였다. 임의 이론에 국한하지 않고, 이것은 MHC 클래스 II 일배체형으로 인한 이들 공여자에서 이들 에피토프의 더 큰 면역원성 또는 미경험 레파토리에서 이들 에피토프를 표적화하는 T 세포의 더 큰 전구체 빈도를 반영할 수 있다. 항원에 대한 감도는 DC 로딩 동안 펩티드 적정을 통해서 3개의 선택된 반응에 대해 결정되었다 (도 30C). HIV #5, HIV #6 및 HIV #4에 대한 반응은 각각 0.45 μM, 0.43 μM 및 9.1 μM의 EC_{50} 을 입증하였다.

[0656] **실시예 25 - T 세포 제조 프로토콜 3**

[0657] *재료:*

[0658] AIM V 배지 (Invitrogen)

[0659] 인간 FLT3L, 전임상 CellGenix #1415-050 스톡 50 ng/㎕

[0660] TNF-α, 전임상 CellGenix #1406-050 스톡 10 ng/㎕

[0661] IL-1β, 전임상 CellGenix #1411-050 스톡 10 ng/㎕

[0662] PGE1 또는 알프로스타딜 - 체코의 Cayman 스톡 0.5 ㎍/㎕

[0663] R10 배지- RPMI 1640 glutamax + 10% 인간 혈청+ 1% PenStrep

[0664] 20/80 배지- 18% AIM V + 72% RPMI 1640 glutamax + 10% 인간 혈청 + 1% PenStrep

[0665] IL7 스톡 5 ng/㎕

[0666] IL15 스톡 5 ng/㎕

[0667] *절차:*

[0668] 단계 1: 5백만 PBMC (또는 관심 세포)를 2 mL AIM V 배지 중 FLT3L 존재의 24웰 플레이트의 각 웰에 도말한다.

[0669] 단계 2: AIMV 중에서 - 펩티드 로딩 및 성숙화

[0670] 1. 관심 펩티드 풀 (펩티드 없는 조건 제외)을 PBMC (또는 관심 세포)와 각 웰에서 혼합한다.

[0671] 2. 0.5 내지 4시간 동안 인큐베이션시킨다.

[0672] 3. 인큐베이션 이후에 각 웰에 대해 성숙화 칵테일 (TNF-α, IL-1β, PGE1, 및 IL-7)을 혼합한다.

[0673] 단계 3: 인간 혈청을 각 웰에 10 부피%의 최종 농도로 첨가하고 혼합한다.

[0674] 단계 4: 배지를 IL7 + IL15가 보충된 새로운 RPMI+ 10% HS 배지로 교체한다.

[0675] 단계 5: IL7 + IL15가 보충된 새로운 20/80 배지로 인큐베이션 기간 동안 1-6일 마다 교체한다.

[0676] 단계 6: 5 백만 PBMC (또는 관심 세포)를 2 mL AIM V 배지 중 FLT3L 존재의 새로운 6-웰 플레이트의 각 웰에 도말한다.

[0677] 단계 7: 재-자극을 위한 펩티드 로딩 및 성숙화 (새로운 플레이트)

[0678] 1. 관심 펩티드 풀 (펩티드 없는 조건 제외)을 PBMC (또는 관심 세포)와 각 웰에서 혼합한다.

[0679] 2. 1시간 동안 인큐베이션시킨다.

[0680] 3. 인큐베이션 이후에 각 웰로 성숙화 칵테일을 혼합한다.

[0681] 단계 8: 재-자극:

[0682] 1. 제1 자극 FLT3L 배양물을 계측하고 5 백만 배양된 세포를 새로운 재-자극 플레이트에 첨가한다.

[0683] 2. 배양 부피를 5 mL (AIM V)이 되게 하고 500 ㎕의 인간 혈청 (10 부피%)을 첨가한다.

[0684] 단계 9: 3 mL의 배지를 제거하고 IL7 + IL15가 보충된 6 mL의 RPMI+ 10% HS 배지를 첨가한다.

[0685] 단계 10: 배지의 75%를 IL7 + IL15가 보충된 새로운 20/80 배지로 교체한다.

[0686] 단계 11: 필요하면 재-자극을 반복한다.

[0687] **실시예 26 - T 세포 제조 프로토콜 3을 사용한 실험 데이터**

[0688] T 세포는 T 세포 제조 프로토콜 3을 사용해 제조하였고 자극된 T 세포를 분석하였다. 샘플은 흑색종을 갖는 2명 환자로부터 수득하였다. T 세포는 실시예 24에 기술된 바와 유사한 어세이를 사용해 분석하였다. 도 34는 흑색종을 갖는 2명 환자로부터 유도된 $CD8^+$ T 세포 반응을 정량한 pMHC 멀티머 그래프를 보여준다. 본 명세서에서 사용되는, NEO-STIM은 T 세포 제조 프로토콜을 의미한다. 도 35는 1, 2, 3, 또는 4 기능의 조합으로 확인되는, 흑색종을 갖는 환자에서 유도된 기억 및 신생 CD8+ T 세포 반응의 다기능성 프로파일의 결과를 도시한다. 하나 이상의 기능은 IFNɣ, TNFα, CD107a 및 4-1BB)로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 생성이다. 도 36은 돌연변이 및 야생형 펩티드에 대한 흑색종을 갖는 환자에서 유도된 기억 및 신생 CD8+ T 세포 반응의 특이성을 보여준

다. 도 37A 및 37B 및 37C는 $CD8^{+}CD107a^{+}$ T 세포의 빈도로 정량된 (위 패널) 흑색종 환자에서 유도된 기억 및 신생 반응의 세포독성 프로파일을 보여준다. 도 37A 및 37B 및 37C의 아래 패널은 $aCAS3^{+}$ 종양 세포의 빈도로 정량된, 이들 T 세포 반응에 의한 표적 세포 사멸을 보여준다. 도 38A는 흑색종 환자에서 네오항원 특이적 $CD4^{+}$ T 세포 반응의 확인을 보여준다. 도 38B는 돌연변이 및 야생형 펩티드에 대한 도 38A에서 확인되는 이들 $CD4^{+}$ T 세포 반응의 특이성을 보여준다. 도 38C는 1, 2, 3, 또는 4 기능의 조합으로 확인되는 바와 같이, 이들 $CD4^{+}$ T 세포 반응의 다기능성 프로파일을 보여준다. 하나 이상의 기능은 IFNɣ, TNFα, CD107a 및 4-1BB로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 생성이다.

[0689] **실시예 27 - T 세포 제조 프로토콜 1 또는 2를 사용한 실험 데이터**

[0690] T 세포는 T 세포 제조 프로토콜 1 또는 대안으로서, 프로토콜 2를 사용해 제조되었다. 자극된 T 세포는 실시예 24에 기술된 바와 같이 유사한 어세이를 사용해 분석되었다. 도 39는 1, 2 또는 3 기능의 조합 (예를 들어, 하나 이상의 기능은 IFNɣ, TNFα 및 CD107a로부터 선택된 하나 이상의 인자의 생성임)으로 확인되는, 에파카도스타트 첨가 존재 또는 부재에서 2명의 건강한 공여자 (예를 들어, HD66 및 HD63)에서 유도된 기억 반응의 기능성을 보여준다. 도 40은 에파카도스타트 첨가의 존재 또는 부재로 6 복제물 유도에서 유도된 신생 CD8+ T 세포 반응의 백분율 ('히트율', 4명 건강한 공여자의 평균)을 보여준다. 도 41A는 PD-1 차단 항체의 첨가 존재 또는 부재에서, 본 명세서에 제공된 T 세포 제조 프로토콜로 유도 후 공여자 HD55로부터의 항원 특이적 세포의 절대수를 보여준다. 도 41B는 PD-1 차단 항체 첨가의 존재 또는 부재에서, 본 명세서에 제공된 T 세포 제조 프로토콜로 유도 후 공여자 HD67로부터의 항원 특이적 세포의 절대수를 보여준다. 도 42A는 IL-12 첨가의 존재 또는 부재에서, 신생 $CD8^{+}$ T 세포 반응의 $pMHC^{+}$ $CD8^{+}$ T 세포의 분율을 보여준다. 도 42B는 IL-12 첨가 존재 또는 부재에서 신생 $CD8^{+}$ T 세포 반응 내에서 $CD8^{+}$ T 세포의 백분율을 보여준다.

[0691] **실시예 28: 환자-특이적 네오항원에 대해 유도된 면역 반응의 심층 특징규명**

[0692] 환자-특이적 네오항원은 생물정보학 엔진을 사용해 예측하였다. 예측 네오항원을 포괄하는 합성 장형 펩티드가 면역원성 능력을 평가하기 위한 자극 프로토콜에서 면역원으로 사용되었다. 자극 프로토콜은 환자-유래 APC에 이들 네오항원-코딩 펩티드를 공급하고, 이어서 네오항원 특이적 T 세포를 프라임하기 위해 환자-유래 T 세포와 공배양하는 것을 포함한다.

[0693] 다수 라운드의 자극이 기억 및 신생 T 세포 반응을 프라임, 활성화, 및 확장시키기 위한 자극 프로토콜에 도입된다. 이들 네오항원-특이적 T 세포의 특이성, 표현형 및 기능성은 하기 어세이로 이들 반응을 특징규명하여 분석되었다: pMHC 멀티머를 사용한 조합 코딩 분석을 사용하여 다수의 네오항원-특이적 CD8+ T 세포 반응을 검출하였다. 다중복합, 다수매개변수 유세포측정을 사용한 리콜 반응 어세이를 사용하여 CD4+ T 세포 반응을 확인하고 검증하였다. CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응의 기능성은 IFN-ɣ 및 TNFα를 포함하는 프로-염증성 사이토카인의 생성, 및 탈과립화의 마커로서 CD107a의 상향조절을 측정하여 평가하였다. 네오항원-발현 종양주를 사용한 세포독성 어세이를 사용하여 천연적으로 프로세싱되고 제시된 항원에 대한 반응으로 표적 세포를 인식하고 사멸시키는 CD8+ T 세포 반응의 능력을 이해하였다. 세포독성은 T 세포 상에서 CD107a의 세포 표면 상향조절 및 네오항원-발현 종양 세포 상에서 활성 캐스파제3의 상향조절을 통해 측정하였다. 이 연구에서, 흑색종 환자 샘플 (NV6 및 NV10)은 IRB 승인 하에 수득하였다.

[0694] 자극 프로토콜은 사전-존재 CD8+ T 세포 반응의 확장을 비롯하여 신생 CD8+ T 세포 반응의 유도에서 성공적이었다 (표 11).

표 11

환자	HUGO 기호	전체 유전자 명칭	유형
NV10	$SRSF1_{E>K}$	세린 및 아르기닌 풍부 스플라이싱 인자 1	CD8
	$ARAP1_{Y>H}$	안키린 반복부 및 pH 도메인	
	$PKDREJ_{G>R}$	난자 젤리층에 대한 폴리시스틴 패밀리 수용체	
	$MKRN1_{S>L}$	마코린 링 핑거 단백질 1	CD4
	$CREBBP_{S>L}$	CREB 결합 단백질	
	$TPCN1_{K>E}$	2 포어 결편 채널 1	
NV6	$AASDH_{neoORF}$	아미노아디페이트-세미알데히드 데히드로게나제	CD8
	$ACTN4_{K>N}$	액티닌 알파 4	
	$CSNK1A1_{S>L}$	카세인 키나제 1 알파 1	
	$DHX40_{neoORF}$	DEAH-박스 헬리카제 40	
	$GLI3_{P>L}$	GLI 패밀리 징크 핑거 3	
	$QARS_{R>W}$	글루타미닐-TRNA 신써타제	
	$FAM178B_{P>L}$	서열 유사성 178 구성원 B 존재 패밀리	
	$RPS26_{P>L}$	리보솜 단백질 S26	

[0695]

[0696] 흑색종 환자 NV10로부터의 PBMC를 사용하여, 사전-존재 CD8+ T 세포 반응의 확장은 4.5%의 CD8+ T 세포 내지 72.1%의 CD8+ T 세포로 관찰되었다 ($SRSF1_{E>K}$). 게다가, 자극 프로토콜은 환자-특이적 네오항원에 대해 2가지 가정된 신생 CD8+ T 세포 반응을 유도시키는데 효과적이었다 ($ARAP1_{Y>H}$: 6.5%의 CD8+ T 세포 및 $PKDREJ_{G>R}$: 13.4%의 CD8+ T 세포; 자극 과정 이전에 세포는 검출불가하였음) (도 34). 자극 프로토콜은 다른 흑색종 환자, NV6로부터의 PBMC를 사용하여 이전에 기술 및 신규 모델 네오항원에 대한 7가지 신생 CD8+ T 세포 반응을, 다양한 규모까지 성공적으로 유도하였다 ($ACTN4_{K>N}$ $CSNK1A1_{S>L}$ $DHX40_{neoORF}$ 7, $GLI3_{P>L}$, $QARS_{R>W}$, $FAM178B_{P>L}$ 및 $RPS26_{P>L}$, 범위: 0.2%의 CD8+ T 세포 내지 52%의 CD8+ T 세포). 추가로, 환자-특이적 네오항원에 대한 CD8+ 기억 T 세포 반응이 확장되었다 ($AASDH_{neoORF}$, 자극 후 최대 13%의 CD8+ T 세포).

[0697] 환자 NV10 유래의 유도된 CD8+ T 세포는 보다 상세하게 특징규명되었다. 돌연변이체 펩티드 로딩된 DC로 재-챌린지 시, 네오항원-특이적 CD8+ T 세포는 1, 2, 및/또는 모든 3개 기능을 나타냈다 ($SRSF1_{E>K}$ 및 $ARAP1_{Y>H}$ 에 대해 각각 16.9% 및 65.5% 기능성 CD8+ pMHC+ T 세포) (도 35).

[0698] 상이한 농도의 네오항원성 펩티드로 재-챌린지 시에, 유도된 CD8+ T 세포는 돌연변이체 네오항원성 펩티드에 유의하게 반응하였지만 야생형 펩티드에는 그렇지 않았다 (도 36).

[0699] 환자 NV10에서, CD4+ T 세포 반응은 돌연변이체 네오항원 로딩된 DC를 사용한 리콜 반응 어세이를 사용해 확인하였다 (도 38A-38C). 3개 CD4+ T 세포 반응은 돌연변이체 네오항원성 펩티드가 로딩된 DC에 대한 반응성을 기반으로 확인되었다 ($MKRN1_{S>L}$, $CREBBP_{S>L}$ 및 $TPCN1_{K>E}$). 이들 CD4+ T 세포 반응은 또한 돌연변이체 네오항원성 펩티드로 재-챌린지 시에 다기능성 프로파일을 보였다. CD4+ T 세포의 31.3%, 34.5% 및 41.9%는 1, 2, 및/또는 3 기능을 나타냈다: 각각 $MKRN1_{S>L}$, $CREBBP_{S>L}$ 및 $TPCN1_{K>E}$ 반응.

[0700] 환자 NV10으로부터 유도된 CD8+ 반응의 세포독성 능력을 또한 평가하였다 (도 37A-37C). $SRSF1_{E>K}$ 및 $ARAP1_{Y>H}$ 반응은 CD8+ T 세포 상에서 CD107a 및 공배양 후 돌연변이체 구성체가 형질도입된 종양 세포 상에서 활성 캐스파제3의 유의한 상향조절을 보였다.

[0701] 자극 프로토콜을 사용하여, 예측되는 환자-특이적 네오항원을 비롯하여, 모델 네오항원은 환자 물질에서 다수 네오항원-특이적 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응이 유도에 의해 면역원성인 것으로 확인되었다. 다기능성 및 돌연변이체- 특이적 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응을 유도하는 능력은 고-품질 네오항원을 예측하고 강력한 T 세포 반응을 생성시키는 능력을 증명한다. 자극 과정의 종료시에 다수의 농축된 네오항원-특이적 T 세포 개체군 (기억 및 신생)의 존재는 새로운 T 세포 반응을 상승시키고 암 환자를 치료하는 효과적인 암 면역요법을 생성시키는 능력을 입증한다.

[0702] **실시예 29 - 세포의 선택적 고갈의 효과**

[0703] 이 실시예에서, 세포 개체군, 생체외 세포 확장 속도 및 활성화된 T 세포의 생성에 대한 PBMC 배양물로부터의 불필수 세포의 선택적 고갈의 효과를 조사하였다. 고갈 연구의 목적은 (불필수 PBMC의 고갈을 통해) 필수 APC 개체군에 대한 농축에 의해 CD8 T 세포 프라이밍을 증가시키는 것이었다.

[0704] PBMC는 공여자, HD66, HD67, HD69로부터 단리하였고; 세포 배양은 G-Rex 24웰 플레이트에서 준비하였다. 세포는 펩티드 농도: 0.4μM (0.4 mM 펩티드 스톡)의 존재하에서 배양하였다. 펩티드 풀: 2개 세트의 펩티드가 검사되었다: 고도의 면역원성 및 저 면역원성 HIV3, ACTN4, CSNK1A1 펩티드. 추가로, MART-1은 기억 T 세포 반응의 경우에서 처럼, 높은 전구체 빈도로 세포의 확장을 평가하기 위해 사용되었다. PBMC는 실험군 당 표지된 바와 같은 고갈을 먼저 겪었고, 그 다음으로 Flt3L로 자극하였다. 그룹은 CD14/25 고갈 (Base Flt3L); 기저 Flt3L + CD11b 고갈 (CD11b 바이오틴 AB 사용); 기저 Flt3L + CD11b/CD19 고갈 (CD11b 바이오틴 AB, CD19 미세비드 사용)을 포함한다.

[0705] 판독 -하기 어세이를 유도 후 D16에 수행하였다: 세포의 확장 배수, 멀티머 분석. 세포 계측은 총 개체군의 절대수 또는 백분율로서 표시되었다. 도 46-47은 표시된 고갈 수행 후 0일에 최종 세포를 보여준다. 도 48은 CD11b 및 CD19 세포의 고갈이 확장의 배수 변화에 영향이 없었다는 것을 보여준다. 도 49A 및 도 49B는 CD11b 또는 CD11b 및 CD19의 고갈이 펩티드 로딩된 DC에 의해 프라임된, 미경험 T 세포의 히트율을 실제로 증가시킨다는 것을 보여준다. 저 또는 고 면역원성 펩티드를 사용했을 때 편차가 관찰되지 않았다. CD11b 및 CD11b/CD19 세포의 고갈은 항원 로딩된 APC로 제1 자극 후에 항원 특이적 CD8+T 세포의 현저한 개선을 보인다. 도 50에 도시된 바와 같이, MART-1 펩티드 경우 CD8+ 항원 특이적 T 세포에서, 단일 자극 이후에 2배 초과의 증가 (좌)가 있었다. 고 및 저 면역원성 펩티드로 세포를 자극했을 때 유사한 증가가 존재한다. 다수 유도에서, 증가는 더욱 확대되었다 (데이터 미도시). 전체로, pDC 및 $CD141^{+}$ DC의 증가된 빈도는 개선된 T 세포 유도와 상관있었다.

[0706] 세포 개체군, 생체외 세포 확장 속도, 및 활성화된 T 세포의 생성에 대한 PBMC 배양물로부터의 CD3+, CD19+, CD11b+, CD14+ 및 CD25+ 세포의 선택적 고갈에 의한 항원 제시 세포 (APC)의 추가 농축을 조사하였다. PBMC는 공여자, HD101, HD113, HD114로부터 단리하였고; 세포 배양물은 G-Rex 24웰 플레이트에서 준비하였다. 3개 세트의 세포를 다음과 같이 고갈시켰다: 5 x 10^6 세포가 CD14/CD25 고갈되었고 (기저); 5 x 10^6 세포는 CD14/CD25/CD11b/CD19 고갈 (기저+ CD11b/CD19)되었고; 5 X 10^5 세포는 CD3/CD19/CD11b/CD25/CD14 고갈되고 5 X 10^6 기저 + CD11b/CD25 세포와 혼합되었고, 이 세트는 이 실시예를 기술하는 도면에서 APC로 명명된다. 다양한 세포 개체군은 다음과 같이 세포 표면 마커로 확인하였다: CD141+ DC는 CD141 및 Clec9A 발현의 검출을 통해 확인되었고; CD1c+DC는 CD1c 발현의 검출로 확인되었고; 형질세포양 DC (pDC)는 CD303 및 CD123 발현으로 확인되었다. 도 51A-51C에 도시된 바와 같이, pDC는 농축 세트 (APC) 내에서 가장 과-표시된 APC였다. 제1 자극 동안 APC 농축은 히트율을 개선시킨다 (항원 특이적 CD8+T 세포) (도 51D 및 51E).

[0707] **실시예 30. 항원 반응성에 대한 초기 또는 후기 자극된 세포의 기여**

[0708] 항원 반응성에 초기 또는 후기에 첨가된 세포 개체군의 기여를 조사하기 위해, 세포 (T 세포 포함)는 항원 로딩된 APC로 자극 전에 막-투과성 아민-반응성 염료 (예를 들어, 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 또는 TagIT Violet™)로 표지하였고 항원 특이적 T 세포의 확장은 염료의 존재 및 희석율로 표시되었다. 제2 자극을 적용했을 때, 이미 14일 동안 배양된 세포의 개체군이 하나의 염료로 표지되었는데 반해서, 항원 로딩된 APC 및 T 세포의 새로운 조제물을 함유하는 세포의 다른 개체군은 다른 염료로 표지되었고, 2개 개체군은 함께 혼합하여 재자극 또는 확장을 수행하였다. 전체 항원 특이적 T 세포 풀에 대한 이들 개체군 각각의 상대적 기여는 각 염료의 존재 및 희석율로 표시되었다 (도 52A). 이러한 실험 설계를 사용하여, 새롭게 제조된 세포의 개체군은 21일에 항원 특이적 T 세포를 산출하지 않았다는 것을 언급하였다. 새롭게 제조된 APC를 1일 먼저 (표준 프로토콜, 도 52B에 도시된 계획)와 반대로, 이미 배양된 세포 첨가의 4일 또는 6일 앞서서 (각각 5일 유리한 출발 또는 7일 유리한 출발) 항원으로 사전로딩했을 때, 새롭게 제조된 T 세포는 항원 특이적 분율에 실질적으로 기여하지 않았다는 것을 언급하였다. 동시에, 이미 배양된 T 세포의 증식율은 4일 또는 6일 앞서서 사전로딩된 APC를 사용하여 재자극했을 때 감소되어서, 표준 프로토콜과 비교해 전체적으로 더 낮은 수의 항원 특이적 세포를 야기시켰다는 것을 언급하였다 (도 52C).

[0709] **실시예 31- 네오항원성 펩티드를 코딩하는 메신저 RNA를 사용한 면역 세포의 유도**

[0710] 이 실시예에서, 네오항원성 펩티드 및 네오항원성 펩티드를 코딩하는 메신저 RNA로 면역 세포의 유도를 비교하는 연구를 비교한다.

[0711] 재료: AIM V 배지 (Invitrogen); LS 컬럼, Miltenyi Biotec # 130-042-401, CD14 미세비드, 인간, Miltenyi

Biotec # 130-050-201; CD25 미세비드 II, 인간, Miltenyi Biotec # 130-092-983; MACS 완충제: MACS BSA 스톡 용액 (# 130-091-376)의 autoMACS Finsing 용액으로의 1:20 희석물 (Miltenyi Biotec #130-091-22); 인간 FLT3L, 전임상 CellGenix #1415-050 스톡 50 ng/㎕; CD3 미세비드, 인간, Miltenyi Biotec # 130-050-101; TNF-α, 전임상 CellGenix #1406-050 스톡 10 ng/㎕; IL-1β, 전임상 CellGenix #1411-050 스톡 10 ng/㎕; PGE1 또는 알프로스타딜 - 체코의 Cayman 스톡 0.5 ㎍/㎕; AIMV 배지 + 2, 5, 10% 인간 혈청 + 1% PenStrep; IL7 스톡 5 ng/㎕; IL15 스톡 5 ng/㎕; 24웰 G-Rex 플레이트; IVT mRNA (1 ㎍/㎕); RNAse zap; Lonza P3 뉴클레오펙션 키트 및 완충액과 100 ㎕ 큐벳.

[0712] **절차**:

[0713] **0일: PBMC의 CD14 및 CD25 고갈 및 FLT3L 처치**

[0714] 1. PBMC를 해동하고 AIM V 배지 중에 10 백만 세포/mL로 계측한다.

[0715] 2. 300xg에서 5분 동안 원심분리로 세포를 펠렛화하고 1시간 동안 벤조나제 (1 ㎕/mL)를 함유하는 따뜻한 배지에 재현탁시켰다. 벤조나제 처치 후, 세포를 계측한다.

[0716] 3. MACS LS 컬럼은 3회 3 mL의 냉 MACS 완충액으로 세척한다.

[0717] 4. PBMC를 300xg에서 5분 동안 스핀하고 50 mL 튜브 중 10^7 세포 당 60 ㎕ MACS 완충액에 재현탁한다.

[0718] 5. 20 ㎕의 CD25II 미세비드 및 20 ㎕의 CD14 미세비드를 10^7 세포 당 MACS 완충액이 더해진 세포에 첨가하였고 15분 동안 4℃ 냉장고 또는 얼음 상에서 인큐베이션시킨다.

[0719] 6. 인큐베이션 이후에, 세포의 총 부피는 냉 MACS 완충액을 첨가하여 50 mL로 만들고 세포는 300xg에서 10분 동안 스핀한다. 상등액을 버리고 세포는 2 x 10^8 세포 당 500 ㎕에 재현탁한다.

[0720] 7. 세포는 Miltenyi MidiMACS 컬럼에 부착된 LS 컬럼을 통과시켰다. 다음으로 컬럼을 3회 3 mL의 MACS 완충액으로 세척하였다.

[0721] 8. 수집 튜브로 자석을 통해 통과된 세포를 계측하고 스핀한다. 세포를 계측하고 50 ng/mL의 FLT3L이 존재하는 2 mL의 AIM V 중 5 백만 세포를 24웰 플레이트에 도말하였다.

[0722] **1일: FLT3L 처치된 PBMC의 뉴클레오펙션**

[0723] 1. 2 mL의 AIM V 배지를 24웰 GREX 플레이트의 웰에 도말하였다. 플레이트는 15 mL 코니칼 튜브 중 별도 5 mL 배지와 함께 평형화를 위해 인큐베이터에 위치시켰다.

[0724] 2. 세포 리프터를 사용하여, 밤새 FLT3L로 자극된 세포를 웰로부터 수확하였다.

[0725] 3. 모든 세포는 50 mL 코니칼 튜브에 수집하였고 웰은 추가 1 mL의 냉 배지로 세척하였다. 세포는 300xg에서 7분 동안 스핀하였다.

[0726] 4. CD3 단리는 제조사의 프로토콜에 따라서 FLT3L 자극된 PBMC 상에서 수행하였다. 자석에 남겨진 CD3 단리된 세포를 컬럼에서 배출시키고, 계측하였으며, 평형화된 25웰 플레이트의 적절한 웰에 도말하고 인큐베이터에 위치시켰다.

[0727] 5. Miltenyi 비드 분리를 통해서 흐름으로부터 수집된 나머지 세포는 스핀하였고 (300xg에서 7분), 펠렛을 얼음 상에 위치시켰다.

[0728] 6. 1 ㎍-10 ㎍의 적절한 RNA를 각각의 AMAXA 뉴클레오큐벳 용기에 첨가하고 얼음 상에 위치시켰다 (부피는 10 ㎕ 미만으로 유지시켰고; RNA는 필요하면 RNAse 무함유 물로 희석하였음).

[0729] 7. 세포는 큐벳 당 백만 세포당 100 ㎕의 P3 완충액을 사용해 P3 완충액에 세포를 재현탁시켰다.

[0730] 8. 세포가 더해진 100 ㎕의 P3 완충액은 뉴클레오큐벳 중 RNA와 혼합하였고 적절하면 CB150, DU100, EA100, EU100 또는 CU110 프로토콜을 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 뉴클레오펙션시켰다.

[0731] 9. 이어서 큐벳을 10분간 얼음 상에서 인큐베이션시켰고, 인큐베이션 후에, 100 ㎕의 예열된 배지를 첨가하였다.

[0732] 10. 이어서 세포를 24웰 플레이트의 적절한 웰에 도말하였고 인큐베이터에 위치시켰다.

[0733] **2일: 세포 성숙화 및 인간 혈청의 첨가**

[0734] 1. TNF-α, IL-1β PGE1, IL-7을 함유하는 성숙화 칵테일을 뉴클레오펙션 후 2-3시간에 첨가하였다. 플레이트를 다시 인큐베이터로 복귀시켰다. 8-12시간 후에, 인간 혈청을 각 웰에 첨가하여 웰 부피 중 10%의 인간 혈청이 되게 하였다. 플레이트는 배양을 위해 인큐베이터에 첨가되었다.

[0735] **5일, 8일, 10일 및 12일: 배지 교체 및 IL-7 및 IL-15의 공급**

[0736] 1. 5 ng/mL의 IL-7 및 5 ng/mL의 IL-15가 보충된 10% 인간 혈청을 함유하는 AIMV를 배양 성장으로 결정하여 필요하면 배양물에 첨가하였다.

[0737] **12일-14일: 배양된 T 세포의 재자극을 위해 0일-2일의 프로토콜을 반복한다**

[0738] **14일: 배양된 T 세포의 재자극**

[0739] 1. T 세포 배양물을 수확하고, 계측하고 유도된 배양물 대 뉴클레오펙션된 PBMC의 1:1 비율로 새로운 뉴클레오펙션된 배양물을 재도말하였다. 인간 혈청을 배양물에 첨가하여서 인간 혈청의 배양 부피는 AIMV 중 10%이다.

[0740] **16일 및 19일: 배지 교체 및 IL-7 및 IL-15의 공급**

[0741] 1. 5 ng/mL의 IL-7 및 5 ng/mL의 IL-15가 보충된 10% 인간 혈청을 함유하는 AIMV는 배양 성장으로 결정하여 필요시 배양물에 첨가하였다.

[0742] **19일-21일: 배양된 T 세포의 재자극을 위해 0일-2일의 프로토콜을 반복한다.**

[0743] **21일: 배양된 T 세포의 재자극**

[0744] 1. T 세포 배양물을 수확하고, 계측하고 유도된 배양물 대 뉴클레오펙션된 PBMC의 1:1 비율로 새로운 뉴클레오펙션된 배양물을 재도말하였다. 인간 혈청은 배양물에 첨가하여서 인간 혈청의 배양 부피는 AIMV 중 10%이다. 임의의 추가 세포는 추가 분석을 위해 냉동 저장된다.

[0745] **23일 및 26일: 배지 교체 및 IL-7 및 IL-15의 공급**

[0746] 1. 5 ng/mL의 IL-7 및 5 ng/mL의 IL-15가 보충된 10% 인간 혈청을 함유하는 AIMV를 배양 성장으로 결정하여 필요에 따라 배양물에 첨가하였다.

[0747] **28일: 유도된 T 세포의 수확**

[0748] 2. T 세포 배양물을 수확하고, 계측하고, 추가 분석을 위해 냉동시킨다.

[0749] 결과: 도 53은 상기 기술된 연구로부터의 예시적인 데이터를 도시한다. 확장 배수는 네오항원성 펩티드 (우세 펩티드) 또는 사전 확인된 네오항원성 펩티드 또는 펩티드를 코딩하는 mRNA, 또는 미관련 mRNA (GFP)를 코딩하는 mRNA를 사용한 세포의 자극으로부터 연구의 종료 시에 평가하였다. mRNA 유도된 세포는 배수 변화의 놀라운 증가를 나타낸다. 특히, GFP 발현 mRNA 세트에 대한 샘플은 오직 하나였고, 그래서 추가 실험을 수행하여 이 데이터를 검증할 것이다. 그럼에도, 그 경향은 mRNA 유도된 세포의 배수 변화에 인상적인 증가를 보인다.

[0750] 도 54는 유세한 펩티드 (바이러스 펩티드의 혼합물)의 선택을 사용하는 연구로부터의 예시적인 데이터를 도시한다. Irr RNA = 미관련 RNA. 이러한 실험에서, CD3+ 세포는 mRNA로 유도 전에 일부 샘플에서 제거되었다 (도면에서 -CD3으로 표시). 세포를 동일한 mRNA로 유도시키고, 오직 CD3 세포만이 먼저 DOM RNA-CD3로서 표시된 세트로부터 제거된, DOM RNA-CD3 샘플 및 DOM-RNA를 비교하면, CD3의 존재 또는 부재는 유도 프로파일에서 현저한 편차를 일으키지 않았음을 확인하였다. 일반적으로, 네오항원성 펩티드를 코딩하는 mRNA에 의한 자극은 멀티머 양성 세포로 확인되는 바와 같이, 항원 특이적인 T 세포의 높은 수준의 유도를 야기하였다.

[0751] 도 55는 예시적인 데이터를 도시하며, 여기서는 자극 및 확장의 종료시에 수득된 CD8+ T 세포는 항원 특이적 기억 T 세포 반응에 대한 유세포측정으로 평가하였다. 바이러스 펩티드로 유도된 실험 세트의 CD8+ T 세포는 유사한 특이성 프로파일을 보이고, 대략 46%의 CD8+ T 세포가 멀티머에 특이적인 것을 보여주는 도 54의 위 패널 (EBV BMLF 펩티드, 좌; EBV BMLF 펩티드 코딩 mRNA, 우)에 도시된다. 도 55 아래 패널 (사전 확인된 ME-1 펩티드, 좌; ME-1 펩티드 코딩 mRNA, 우)은 RNA로 T 세포의 더 높은 유도를 보여주었다. 이 연구는 저 면역원성 항원의 경우에 유도를 위해 mRNA를 사용하는 것이 보다 더 유리할 수 있다는 것을 보여준다.

[0752] **실시예 32 - T 세포 프라이밍 효율 및 항원 특이적 T 세포 수율을 증가시키기 위한 방법**

[0753] 이 실시예에서, PBMC는 T 세포 프라이밍의 효율 및 항원 특이적 T 세포의 수율을 증가시키기 위해 PBMC 개체군으로 항원 코딩 서열을 코딩하는 RNA로 직접 전기천공된다. 과정은 도 56A 및 56B에 단순화된 작업 흐름도로 대표된다. 특정 대상체를 위한 개인화 항원 (예를 들어, 네오항원)은 대상체의 게놈 또는 엑솜 서열분석 결과 및 대상체 특이적 네오항원의 확인을 기반으로, 신뢰할만한 MHC-펩티드 결합 예측자 플랫폼으로부터 개발될 수 있다. 신뢰할만한 MHC-펩티드 결합 예측자 프랫폼은 적어도 부분적으로 국제 특허 출원 PCT/US2018/017849 및 PCT/US2019/068084에 개시되어 있고 이것들은 참조로 완전히 본 명세서에 편입된다. 대상체의 HLA 레파토리의 결정 이후에, 암 유형에 특이적인 잠재적 항원 에피토프를 예측자에서 실행시키고, 상위 예측된 결합체를 확인한다. 하나 이상의 RNA 구성체를 생성시킨다. 각각의 RNA 구성체는 확인된 에피토프를 포함하는 다수 항원을 코딩하는 핵산을 포함한다. mRNA는 전기천공 또는 뉴클레오펙션으로 PBMC에 도입된다. PBMC는 예를 들어 항원 제시 세포가 예컨대 PBMC 샘플에서, T 세포와 공배양되는 경우에, RNA-코딩된 항원 펩티드를 발현하여 T 세포에 제시한다 (도 56A).

[0754] 펩티드 및 mRNA 자극의 예시적인 동시 비교를 위해서, PBMC 샘플은 CD14 및 CD25 발현 세포를 고갈시키고 도 56B에 도시된 바와 같은 기본 작업흐름을 통해 채취된다.

[0755] *항원 제시를 위해 PBMC 상에 발현을 위한 다수 면역원성 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 RNA 구성체 설계*

[0756] 예시적인 RNA 구성체는 도 57A에 도시된다. RNA 구성체는 네오항원 스트링을 포함하고, 여기서 다수의 항원성 에피토프를 코딩하는 다수의 mRNA 서열은 결찰되어 5' - 3' 콘카타머를 형성한다. mRNA에 의해 코딩되는 적어도 하나의 항원은 네오항원이다. mRNA는 이 경우에 T7 프로모터로 예시되는, 프로모터 서열에 작동적으로 연결된, 5'-캡, 3'폴리A 테일 및 항원의 콘카타머형 스트링을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. PBMC의 로딩에 사용되는 구성체는 사례마다 다양하므로 네오항원 스트링을 코딩하는 서열이 광범위하게 다양하다. 구성체의 네오항원 스트링 부분의 상세도는 도 57B에 도시된다. 절단 서열, 예를 들어, QLGL, 및 K는 신중하게 최적화되어서 콘카타머형 네오항원 스트링 내 하나 이상의 항원을 코딩하는 서열 사이에 위치된다. 단일 mRNA 사슬에서 항원 및 절단 서열을 코딩하는 서열의 배열을 비롯하여 특이적 서열은 PBMC에 의한 우수한 에피토프 제시를 수득하고 이후 항원 반응성 T 세포의 수율을 최적화하기 위해 개별적으로 최적화된다. 예시적인 항원 또는 네오항원 서열은 HIV-3 에피토프, CSNK1A1 에피토프, mCDK4 에피토프, mME1 에피토프, 및 Gli3 에피토프로부터 수득된다. 소정 에피토프-코딩 서열에 신중하게 병치되는 절단 촉진 서열의 설계 및 배치는 코딩된 에피토프가 mRNA가 형질감염되었을 때 천연적으로 에피토프 서열 내에서 우연적으로 절단되는 것이 아님을 보장하여서, 각각의 에피토프는 PBMC에 의한 발현 및 제시를 위해 표시된다.

[0757] *5'-캡 및 폴리A 구성요소*

[0758] mRNA에 5'-캡 포함의 존재 및 부재에서 실험을 수행하였다. PBMC는 5'-캡 (Cap1 또는 Cap0)을 갖는 mRNA가 형질감염된다. CAP1 구조는 효과적인 mRNA 전달 및 발현에 중요하였다는 것을 언급하였다. 도 58A는 Cap1 구조의 공-전사 도입을 돕기 위해 아데노신이 5'-UTR 영역에 도입되는 것을 보여준다 (CleanCap). 도 58B-58C에 도시된 바와 같이, Cap1 도입은 감소된 세포 독성 (도 58B) 및 mRNA에 의해 코딩되는 GFP의 더 높은 발현 (도 58C)의 관점에서, Cap0에 비해 더 큰 장점을 갖는다. 폴리A 테일의 길이를 최적화시켰다. 약 120개의 뉴클레오티드의 폴리A 테일은 mRNA 발현에 효과적인 것으로 간주되었다 (데이터 미도시).

[0759] *mRNA 내 뉴클레오티드 변형 및 T 세포 유도에 대한 효과*:

[0760] mRNA는 mRNA 안정성 및 분해에 대한 내성을 증가시키기 위해 시티딘 (C) 또는 우리딘 (U) 잔기를 치환시켜 더 변형된다. 이 실시예에서, CD3, CD14 및 CD25 발현 세포가 선택적으로 고갈된 PBMC는 모든 천연 우리딘-트리포스페이트, 모든 시토신 트리포스페이트 또는 양쪽 뉴클레오시드의 부분량이 변형된 GFP mRNA가 뉴클레오펙션되었고 GFP 발현을 상이한 시점에 추적하였다. 유세포측정은 24시간 (중간 및 아랫줄)에 수행하였다. 72시간에 GFP 양성 생 세포는 Inucyte를 사용해 측정하였다 (윗줄). 우리딘 잔기는 슈도우리딘으로 변형되었고 시티딘은 5메틸시티딘으로 변형되었고, 상이한 실험 세트에서 변형 비율은 표 13에 표시된다.

표 13 - mRNA 중 우리딘 및 시티딘 변형

샘플	치환 % (U/C)
부분 UTP	30/0
전체 UTP	100/0
부분 UTP/부분 CTP	30/30
전체 UTP/전체 CTP	100/100
전체 UTP/부분 CTP	100/30
표준	0/0

[0761]

[0762] 도 59A-59C에 도시된 데이터는 우리딘 및 시티딘의 슈도우리딘 및 5메틸시티딘으로의 부분 및 완전 치환이 더 양호한 번역을 돕고 부분 UTP 치환이 더 높은 수의 네오항원 특이적 세포를 생성시킨다는 것을 의미한다 (도 58B).

[0763] *APC가 펩티드 코딩 mRNA로 자극되었을 때 높은 CD8 히트율*:

[0764] 쇼트머 (9-10개의 아미노산) 또는 롱머 (25개의 아미노산)는 도 60A에 도표로 도시된 바와 같이 콘카타머형 네오항원 스트링의 형태로 구축되었다. 상기 기술된 바와 같은 다수-항원 코딩 mRNA가 뉴클레오펙션된 PBMC가 T 세포를 자극시키는데 사용되었고, 동일한 에피토프를 포함한 펩티드로 공존 비교를 수행하였다. 단형 및 장형 RNA 서열은 멀티머에 반응성인 유사한 CD8+ T 세포를 상승시켰다 (표 14). 특히 강건한 CD8 반응은 롱머 (및 쇼트머)를 코딩하는 RNA를 사용하여 관찰되었다.

표 14 - 펩티드 및 RNA 롱머 및 쇼트머 매개 활성화의 비교

		CD8 히트율 (%)	평균 네오항원+ 빈도 (% CD8 세포)	반응의 다양성 (6 중)	CD4 반응
공여자 1	펩티드 쇼트머	7	0.03%	1	N.A.
	펩티드 롱머	19	0.09%	2	0
	RNA 쇼트머	11	**1.50%**	2	N.A.
	RNA 롱머	8	0.36%	2	0
공여자 2	펩티드 쇼트머	11	0.03%	2	N.A.
	펩티드 롱머	17	0.21%	3	1
	RNA 쇼트머	19	**0.39%**	2	N.A.
	RNA 롱머	20	0.05%	2	0

[0765]

[0766] 도 60B에 도시된 바와 같이, Gli3 에피토프는 충분히 표시되고 mRNA뿐만 이나리 펩티드에 의해 제시되지만, mRNA가 코딩하는 Gli3 쇼트머 에피토프가 로딩된 PBMC는 더 높은 Gli3-특이적 CD8+ T 세포를 생성시켰다 (멀티머 어세이로 검출시). 멀티머 어세이에 대한 대표적인 유세포측정 결과는 도 60C에 도시된다. 대조적으로, 본 명세서에서 사용되는 HIV-3 또는 CDK4 에피토프는 롱머 또는 쇼트머 서열을 포함하는 mRNA 사슬에 의해 충분히 표시되지 않는다. 펩티드 쇼트머 서열은 더 높은 비율의 CDK4-특이적 CD8+ T 세포를 생성하고; 펩티드 롱머는 HIV-3 특이적 CD8+ T 세포를 생성하고, 이를 코딩하는 mRNA 서열은 개별 항원 특이적 CD8+ T 세포를 생성시키지 않는다.

[0767] *PBMC의 유도로 증가된 멀티머 양성 CD8+ T 세포*

[0768] 이 실험에서, PBMC는 일정 개체군의 고갈 및 그들 확장을 위해 다양하게 처치되었고 멀티머 특이성을 조사하였

다. 멀티머 특이적 T 세포 수율은 RNA 구성체로 3개 세트의 PBMC 조제물을 뉴클레오펙션시켜 검사되었다: (i) CD25 고갈된 PBMC, (ii) CD14 및 CD25 고갈된 PBMC, (iii) 냉동된 CD14 및 CD25 고갈된 PBMC. 조제물 (i)에서, T 세포는 조제물 (ii) 및 (iii)에서 처럼 뉴클레오펙션 동안 APC로부터 분리되지 않았다. 이들은 펩티드 로딩된 PBMC의 세트와 비교되었다. 모든 세포는 전기천공 전에 FLT3L로 처치되었다. 다양한 mRNA 구성체가 검사되었고, 도 61A에 그 대표가 도시되어 있다. 종합적으로, CD25 고갈된 RNA 로딩된 PBMC는 도 61B에 표시된 바와 같이 우수한 멀티머 특이적 CD8+ T 세포를 나타내었다. mRNA-로딩된 CD25 고갈된 PBMC는 유사하게 RNA가 로딩된 새로운 또는 냉동된 CD14 및 CD25 고갈된 세포보다 우수하였고, 모든 RNA 로딩된 PBMC는 멀티머에 반응성인 CD8+ T 세포의 생성에서 장점을 가졌다. RNA 로딩 단계 전에 PBMC의 취급을 적게하는 것이 유리하였다는 것이 가능할 수 있다. PBMC 개체군 중 다수 세포 성분의 고갈은 세포 개체군이 다수 항체를 겪게 하는 단계, 세척 단계 및 회수 단계를 요구하였고, 취급되는 양은 세포에 스트레스이다.

[0769] mRNA 로딩된 PBMC는 도 61B 및 하기 15A 및 표 15B에 표시된 바와 같이, 항원 표시에서 더 큰 다양성을 보였다. CD25 고갈된 PBMC는 검출가능한 Gli3 특이적 CD8+ T 세포, 및 ME1 특이적 CD8+T 세포를 가졌다. ME1 특이적 CD8+ T 세포는 모든 다른 세트에서 미미하였다. 도 61C는 Gli3 특이적 세포를 의미하는 대표적인 유세포측정 데이터를 보여준다.

표 15A - 공여자 1

[0770]

	IIL-7 및 IL-15						히트율 (%)	평균 빈도	출발 물질	면역원
	1	2	3	4	5	6				
Gli3		■	■	■	■	■	83%	**6.09%**	**PBMC (CD25-)**	**RNA (25량체 에피토프)**
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3	■	■	■	■	■	■	100%	**0.52%**	**CD14-25- (냉동)**	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3	■	■	■	■	■	■	100%	**0.98%**	**CD14-25- (기본 팔)**	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

표 15B - 공여자 2

[0771]

	IL-7 및 IL-15						히트율 (%)	평균 빈도	출발 물질	면역원
	1	2	3	4	5	6				
Gli3		■	■	■	■	■	83%	**2.68%**	**PBMC (CD25-)**	**RNA (25량체 에피토프)**
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1		■	■		■	■	67%	**2.97%**		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3	■	■			■	■	67%	**0.12%**	**CD14-25- (냉동)**	
HIV-3	■	■	■	■	■	■	100%	**0.02%**		
CSNK1A1							0%			
ME-1				■			17%	**0.01%**		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3	■	■	■	■	■	■	100%	**0.79%**	**CD14-25- (기본 팔)**	
HIV-3	■	■	■			■	67%	**0.01%**		
CSNK1A1							0%			
ME-1	■	■	■	■	■		83%	**0.01%**		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

[0772] 밤새 FLT3L이 처치된 PBMC 및 CD25 고갈된 PBMC는 쇼트머 또는 더 긴 RNA 구성체가 전기천공되었고 항원 특이성 (도 61D)을 비롯하여 확장 배수 (도 61D)는 2 자극 이후 26일에 조사되었다. 이들 데이터는 코딩되는 에피토프

의 길이는 펩티드 롱머 및 쇼트머 자극을 사용한 경우의 관찰과 대조적으로, 강건한 CD8 유도를 획득하는데 결정적이지 않다는 것을 예시한다.

[0773] *성숙화 혼합물의 효과*

[0774] PBMC 자극된 T 세포의 확장을 위해 T 세포 배양 배지에 포함되는 사이토카인 및 성장 인자의 몇몇 칵테일을 조사하였다. 배지 중 성분은 집합적으로 T 세포 성숙화 혼합물이라고 한다. 예시적인 실험 세트에서, 2명 공여자로부터의 PBMC는 이전에 표시된 바와 같이 mRNA 구성체가 뉴클레오펙션되었고, T 세포 확장을 위한 상이한 성숙화 혼합물은 각 공여자 세포로부터의 샘플 세트에서 검사되었다. 검사된 다양한 사이토카인 칵테일은 하기 표 15C에 열거된다. 검사하려는 추가의 사이토카인 칵테일은 IFN-γ LPS, 폴리 I 및 폴리 C, 및 CD40; 및 TLR-7/8 및 LPS를 포함한다.

표 15C. 성숙화 혼합물에서 검사된 사이토카인 및 성장 인자 칵테일

세트	성숙화 혼합물
1	IFN-γ, LPS
2	TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE-2 [TIIP (IL6)]
3	TNF- α, IL-1β, IL-7, PGE-2 [TIIP (IL7)]

[0775]

[0776] 결과는 도 62B-62D에 도시된다. LPS + IFN-γ의 첨가는 26일에 더 높은 멀티머-특이적 세포와 연관된다. 에피토프 각각이 시간 경과에 따라 PBMC로부터 발현되었는지 여부, 또는 하나 이상의 발현이 손상되었는지 여부가 또한 검사되었다.

[0777] CD25 고갈된 PBMC 세포는 RNA가 전기천공되었고 (도60C에 도시) 24시간의 기간 동안 배양되었다. 세포는 표시된 시간에 수확되었고, 펠렛화되어 급속 냉동되었다. HLA-A02:01-펩티드 복합체를 면역침전시키고 나서 펩티드를 용리하고 LC-MS/MS로 분석하였다. 전기천공된 세포로부터 용리된 펩티드 (우)는 양성 확인을 위해 중량 표지된 표준 펩티드 (중량)와 비교하였다 (도 63A). 도 63B는 펩티드, Gli3, HIV3, mACTN4, mCDK4 및 mME1의 각각이 우세 에피토프로서 쉽게 발현되었다는 것을 보여준다.

[0778] 멀티머 어세이 이외에도, 이들 확장된 T 세포의 기능성을 평가하였다. 이 방법으로 생성된 CD8 T 세포는 특이적 에피토프에 면역반응성이었고 표시된 상이한 용량으로 TNF-α 및/또는 IFN-γ 또는 CD107a를 방출하였다 (도 64A -64B). 상기 데이터에 따라서, 사이토카인 반응은 소수의 특이적 T 세포를 생성하는 펩티드와 비교해 고도의 면역원성 펩티드 예컨대 Gli3의 경우에 더 높았다. 도 65는 최적 생성물을 생성하는데 고려되는 기준을 표시한다.

[0779] **실시예 33 - T 세포 치료제에 대한 제조 프로토콜**

[0780] T 세포 치료제 생성물은 하기 요약된 다수-단계 과정으로 제조된다 (도 66). 제조 과정은 다음의 단계들을 포함한다: (A) 종양 생검: 종양 생검은 DNA 및 리보핵산 (RNA) 서열분석을 위한 조직을 제공하기 위해 수행된다. 환자로부터의 말초 혈액의 샘플은 '정상' 조직 대조군으로서 제공된다. (B) 서열분석 및 생물정보학: 전체 엑솜 DNA 서열분석 및 환자의 종양 및 정상 샘플의 RNA 서열분석 및 종양의 서열분석은 돌연변이를 확인하고 검증하는데 사용된다. 면역원성 에피토프를 예측하고 우선화시키고 이후에 제조되는 펩티드를 설계하는데 사용된다. 생물정보학 과정은 공공으로 입수가능하고 사유의 소프트웨어 성분의 조합을 이용한다. 도 66은 계식 방식으로 환자에서 돌연변이의 확인을 통한 샘플 수집에서 시작하여 펩티드의 생성까지 기능의 순서를 예시한다. (C) 선택된 합성 펩티드의 제조: 2개 세트의 펩티드가 제작될 것이며, 세트 당 최대 30-35 펩티드를 갖는다. 세트 1은 항원 제시 세포 (APC)에 대한 직접 MHC 클래스 I 결합을 통한 CD8+ 세포의 생성을 특이적으로 표적화하기 위해 8-11 아미노산 (대체로 9-10 아미노산)일 것이고 세트 2는 APC에 의한 내재화 및 재-제시 이후에 CD4+ 세포의 유도를 특이적으로 표적화하기 위해 대략 25 아미노산일 것이다. (D) 세포 단리: 성분채집술은 T 세포 치료제를 위한 출발 물질로서 환자 APC 및 T 세포를 제공하도록 수행된다. (E) 항원-제시 세포의 단리: 항원-자기유래 CD14+ 수지상 세포 (항원-제시 세포)는 성분채집술 출발 물질로부터 단리된다. 이들 수지상 세포는 이후에 상기 기술된 네오항원성 펩티드로 로딩된다. (F) T-세포 확장: 성분채집술 생성물로부터 단리된 T 세포는 펩티드-로딩된 수지상 세포와 공-인큐베이션된다. 환자의 네오항원-특이적 T 세포는 유도되고, 자극되고, 확장된다. 종양 세포를 직접적으로 또는 간접적으로 인식하여 파괴시킬 수 있는 최종 세포 생성물은 림프고갈 화학요법 이후에 환자에게 재주입된다.

[0781] 이론에 국한하고 싶지 않지만, T 세포 치료제의 작용 기전은 환자 자신의 네오항원-특이적 에피토프를 인식하는

자기유래 CD3+ T 세포를 사용한 환자의 처치에 기반한다. 환자에게 투여되면, 항원 특이적 T 세포는 생체내에서 확장되어서 아폽토시스-유도 리간드 또는 용해성 과립의 방출을 통해서, 항원을 발현하는 종양 세포를 제거시켜서, 환자 종양 퇴행 및 무진행 생존을 야기시킬 것으로 기대된다.

[0782] 출발 물질: 성분채집술을 통해 제공된 환자 자신의 수지상 세포 및 T 세포 (성분채집술 생성물). 성분채집술은 모범 사례에 따라서 지역 승인된 표준 프로토콜 하에 클리닉에서 수행될 것이다. 표 16은 환자 성분채집술 생성물에 대한 예시적인 허용 기준을 표시한다.

표 16 - 환자 성분채집 생성물에 대한 허용 기준

매개변수	허용 기준
시각적 외관 – 세포 용액	최소 또는 전무의 클럼핑
시각적 외관 - 봉투	봉투의 누수, 손상 또는 균열없음
기록 및 표지	고유한 대상체 식별자 일치 서류 (예를 들어, 2 고유 식별자)
운송 조건	필수 운송 조건 준수

[0783]

[0784] 생물정보학 과정이 사용되어서 이후에 제조되고 T 세포 생성물의 제조에서 사용되는 환자 특이적 펩티드의 선택물을 생성시킨다. 생물정보학 소프트웨어는 연속으로 돌연변이를 확인하고 펩티드의 제조를 위한 서열을 선택하는데 사용되는, 사유 알고리즘, 및 출원인이 허가받은 시판 및 공공 입수가능 소프트웨어의 조합으로 이루어진다. 생물정보학 과정은 표준 서열분석 기술로부터의 데이터에서 출발한다. 첫째로, 소프트웨어 알고리즘은 환자 특이적 돌연변이의 확인 및 선택에 요구된다. 두번째로, 펩티드-MHC 결합의 예측이 표준 접근법을 사용해 모든 후보에 대해 수행된다. 이들 충분히 확립된 기술의 조합은 T-세포 자극을 위한 펩티드의 순위매김 및 선택을 가능하게 한다. 모든 소프트웨어는 제1상 임상 시험을 지원하기 위해 의도하는 용도에 적합함을 입증하기 위해 평가되었다. 사유 알고리즘은 사양에 따라 수행되는지 검사하고 검증하였고 최종 에피토프 서열 선택은 예상대로 일관되게 수득되었다.

[0785] 핵심 원재료: 세트 당 최대 30-35 펩티드를 갖는, 2개 펩티드 세트를 제공하도록 제조된 합성 네오항원성 펩티드. 세트 1은 8- 내지 11-량체 (CD8+ 네오항원 특이적 T 세포를 유도하는데 사용)일 것이고 세트 2는 생물정보학 과정으로부터 예측된 환자 특이적 네오항원 서열을 기반으로 대략 25-량체 (CD4+ 네오항원 특이적 T 세포를 유도하는데 사용)일 것이다.

[0786] 합성 펩티드는 환자에게 전달되는 약물 제품의 일부가 아니고 그러므로 출발 물질을 구성하지 않는다. 그들은 적어도 90% 순도인 정제된 제품으로 수득되어 사용된다. 펩티드는 단핵구 유래된 DC의 성숙화 전에 첨가되고, 이후에 환자 종양 세포를 직접적으로 또는 간접적으로 인식하여 제거할 수 있는 네오항원 특이적 T 세포의 유도, 자극 및 확장을 위해 환자의 T 세포에 첨가된다. 펩티드는 아마도 분해 (37℃에서 연장된 기간 동안 수성 조건 하에서 인큐베이션), 세포 세척 및 희석 제조 유닛 작업을 통해서 제거될 가능성이 높고 약물 제품 출시의 일부로서 검사되지 않을 것이다.

[0787] 2개 펩티드 세트는 MHC 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자 둘 모두 상에서 펩티드의 제시를 기반으로 CD8+ 및 CD4+ 세포 둘 모두의 자극을 보장하는 것을 돕기 위해 합성된다.

[0788] *비-임상 개발*: 지금까지 시험관내 약리학 연구로부터의 결과는 다음을 입증하였다: 건강한 공여자로부터의 세포에서, 네오항원 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 미경험 T 세포 구획으로부터 유도될 수 있어서, 관심 종양을 인식할 수 있고 제거할 수 있는 T 세포의 레파토리를 잠재적으로 확대시킨다. 사전 존재하는 CD8+ 기억 T 세포 반응은 더욱 확장될 수 있다. 이것은 네오항원 특이적 기억 T 세포 반응과 동일한 방식으로 거동할 것으로 기대되는, 통상의 바이러스 에피토프에 대한 T 세포 반응의 상황에서 확인되었다. 자극 이후에 다수 염증성 사이토카인의 분비를 통해 측정시 다수 T 세포 이펙터 기능, 즉, 네오항원 및 바이러스 특이적 T 세포의 다기능성이 입증되었고, 이것은 임상적으로 효과적인 면역 반응과 연관된 것으로 여겨진다. 다수 그룹의 연구는 이펙터 기억 및 중심 기억 표현형을 보유하는 T 세포는 양자 세포 요법을 위한 최적 개체군인 것으로 입증되었다. 이들 개체군은 전달 후에 지속되는 것으로 확인되었고 또한 세포독성 기능을 증식시키고 유지하는 능력을 보유한다. 일관되게, T 세포 치료제 중 네오항원 유도된 T 세포의 75% 초과는 대략 4주의 배양 후에 이펙터 기억 표현형이다 (CD45RA-/CD62L-).

[0789] 교차 반응성 평가는 미경험 구획으로부터 유도된, 건강한 공여자로부터의 네오항원-특이적 CD4+ T 세포는 네오

항원성 펩티드 풀 및 이의 야생형 대응물의 적정으로 챌리지시 상응하는 천연 펩티드가 아닌 돌연변이체에 분명하게 반응하는 것이 입증되었다. 이들 발견은 유도된 T 세포 생성물이 돌연변이된 표적에 고도로 특이적인 것을 의미한다. 종양-보유 환자 공여자로부터의 세포 사용 및 관심 네오항원을 발현하는 종양-보유 환자 공여자로부터의 종양 세포주 (난소 및 비소세포 암)의 사멸을 기반으로 개념 증명의 입증을 포함한, 추가 연구가 계획된다.

[0790] 수지상 세포 배양물의 유도체화로 시작하여 약물 제품 제조의 완료까지, 제조 과정은 연속적이다. 그러므로, 표 17에 표시된 제품 출시 검사 계획을 고려하여, 약물 물질은 주입 봉투에 충전 직전에 저온저장 배지에 재현탁된 세포이다. 약물 제품은 이의 최종 용기 및 밀폐 시스템 중에 제제화된 약물 물질이다.

[0791] 약물 물질은 저온저장 배지에 재현탁된 T 세포 치료 자기유래 CD3+ T 세포이다 .

[0792] 약물 제품은 저온저장 배지에 재현탁되어 주입용 최종 봉투에 충전된 T 세포 치료 자기유래 CD3+T 세포이다.

[0793] **출시 검사**

[0794] *외관 검사*

[0795] 외관 검사는 NEO-PTC-01 약물 제품 주입 봉투의 육안 검사를 통해 수행된다.

[0796] *CD3+ T 세포 정체 및 순도*

[0797] 유세포측정 어세이를 사용하여 NEO-PTC-01의 정체 및 순도를 측정한다. 다색 유세포측정은 이종성 세포 생성물의 분석을 가능하게 하고 세포 기반에 따른 다중매개변수 정보를 제공한다. NEO-PTC-01 검사에 사용된 유세포측정 방법은 분석을 위한 패널에 4개 마커를 함유한다; CD3, CD14, CD25 및 생/사멸. 어세이는 NEO-PTC-01의 QC 저온바이알을 해동하여 수행된다. 세포는 96 웰 플레이트에 첨가되고 항-CD3, 항-CD14, 항-CD25 및 생 사멸 염료로 염색된다. CD3은 T 세포에 대한 마커이다. CD14 및 CD25는 과정 모니터링을 위한 패널에 포함된다. 어세이 보고 결과는 생존 CD3+ 세포의 %이다.

[0798] *생존능*

[0799] NEO-PTC-01에 대한 생존능 검사는 EP 2.7.29에 따른 트립판 블루 배제 검사를 사용해 수행된다. NEO-PTC-01 QC 저온바이알을 해동하고 1:1 비율로 트립판 블루와 혼합한다. 생존율 백분율은 하기 식을 사용해 결정된다.

[0800] ((생존 세포)/(총 세포 계측수)) x 100 = 생존능 백분율

[0801] *세포 계측*

[0802] 최종 세포 계측은 NEO-PTC-01의 QC 저온바이알을 사용해 수행된다. 세포 계측은 EP 2.7.29에 따라 혈구계측기를 사용해 수행된다. 세포 농도는 계측된 세포의 수, 샘플 희석 배율, 및 분석을 위한 샘플의 부피를 기반으로 결정된다. 생존 세포 계측은 환자에 대한 세포 용량을 결정하는데 사용된다.

[0803] *내독소*

[0804] 내독소 검사는 Endosafe-Portable Test System (PTS) 시스템 (Charles River)을 사용하고 NEO-PTC-01의 QC 저온바이알을 사용해 수행된다. Endosafe-PTS 시스템은 샘플 중 내독소 농도에 직접적으로 관련된 색상 강도를 측정하는 분광광도계이다. 색상은 발색성 LAL (chromogenic Limulus Amebocyte Lysate)과 샘플의 반응으로 발색된다 (운동 발색 검사 방법). Endosafe-PTS 시스템은 EP 2.6.14의 요건을 모두 충족한다. 시스템은 FDA-승인 1회용 카트리지를 이용한다. 혼입 회수 대조군이 어세이에 사용되어 샘플 매트릭스로부터 억제/증강의 부재를 확인한다.

[0805] *마이코플라스마*

[0806] NEO-PTC-01에 대한 마이코플라스마 검사는 핵산 증폭 (NAT)을 사용해 수행된다. 이 방법에서, NEO-PTC-01 세포-함유 최종 수확 샘플을 2개 유형의 액체 배지에 접종한다. 적절한 양성 (50 콜로니 형성 유닛 (CFU)의 마이코플라스마가 혼입된 액체 배지) 및 음성 대조군 (염수가 혼입된 액체 배지)이 어세이에 포함된다. 접종된 샘플은 35-37℃에서 96±4시간 동안 인큐베이션된다. 인큐베이션 기간의 종료 시에, DNA를 각 샘플로부터 추출한다. DNA는 형광색소로서 SYBR 그린을 사용하는 qPCR 반응의 주형으로 사용된다. 검사 방법은 EP 2.6.7에 기술된 NAT 기술을 사용한 마이코플라스마 검사를 준수한다. 혼입 회수 대조군은 샘플 매트릭스가 마이코플라스마 오염을 검출하는 검사 방법의 능력을 샘플 매트릭스가 방해하지 않는다는 것을 확인하기 위해 어세이에서 사용된다.

[0807] *무균성*

[0808] NEO-PTC-01에 대한 무균성 검사는 BacT/Alert 무균성 시스템 (BioMerieux)을 사용해 수행될 것이다. BacT/Alert 시스템은 무균성 오염을 확인하기 위해 미생물 그 자체의 물질대사를 이용하는 자동 성장-기반 시스템이다. 미생물 오염원은 BacT/Alert 병에 함유된 성장 배지를 대사시켜서 부산물로서 CO_2를 생성시킨다. 각 바이알은 비색 센서를 함유한다. 센서가 미생물에 의해 생성된 CO_2를 흡수하므로, 비가역적 색상 변화를 일으킨다. 검출 한계에 도달하면, 장비는 검사 바이알을 양성으로 표시한다. 인큐베이션 기간 동안 10분 마다 자동 판독된다. BacT/Alert 시스템은 과정 동안 (14일 상등액, 각각의 개별 용기) 및 최종 제제화된 NEO-PTC-01에 대해 사용된다. NEO-PTC-01 최종 제품에 대한 무균성 검사는 BacT/Alert 시스템의 검증이 완료될 때까지 EP 2.6.27 및 EP 2.6.1에 따라서 수행될 것이다. NEO-PTC-01 검사를 위한 샘플 부피는 2개 배지 유형 (혐기성 및 호기성) 간에 나뉘는, 총 제품 부피의 ≥1%이다. BacT/Alert 시스템은 제품-특이적 매트릭스 NEO-PTC-01 검사를 사용해 검증될 것이다. 추가 상세설명은 섹션 3.2.P.5.3에 제공된다. 데이터는 < 14일에 무균성 검사 방법을 지원하는데 사용될 것이다.

[0809] **NEO-PTC-01의 세포 유형을 평가하기 위한 특징규명 검사 유세포측정**

[0810] 유세포측정 패널은 NEO-PTC-01 중 CD3+ T 세포 하위개체군 및 비- CD3+ 세포 유형 (골수 계통의 세포, B 세포, 및 NK 세포 포함)을 평가하기 위해 개발되었다. 추가로, 제품의 분화 상태를 정의하는데 마커가 사용된다. 마커는 CD3, CD4, CD8, Vγ9, CD56, CD14, CD19, CD11c, CD11b, CD62L, CD45RA를 포함한다. NEO-PTC-01 중 CD4+ 및 CD8+ 하위개체군의 백분율은 생존 CD3+ 양성 세포의 백분율로 기록된다.

[0811] **NEO-PTC-01 중 잔류 IL-7 및 IL-15의 평가**

[0812] 일부 실시형태에서, NEO-PTC-01 중 잔류 IL-7 및 IL-15의 수준은 전기화학발광 검출 어세이 키트 (MesoScale Discovery)를 사용한 샌드위치 면역어세이를 사용해 결정될 수 있다.

[0813] **pMHC 멀티머를 사용한 조합 코딩 분석**

[0814] 펩티드-MHC (pMHC) 멀티머를 사용하는 조합 코딩 분석은 네오항원 특이적 CD8+ T 세포 반응의 수 및 규모를 확인하는데 사용된다. T 세포는 표적 세포의 표면 상에 발현된 펩티드 MHC 복합체에 대한 T 세포 수용체 (TCR)의 결합을 통해 그들 표적을 인식한다. pMHC 복합체를 재조합적으로 생성시키고 이들을 형광단에 커플링시켜서, 그들은 유세포측정을 통한 항원 특이적 T 세포를 검출하는 시약으로서 사용될 수 있다. pMHC 멀티머는 NEOPTC- 01 제조에 사용된 환자 특이적 단형 펩티드 각각에 대해 생성된다. 이것은 네오항원 특이적 CD8+ T 세포의 총 분율의 열거를 가능하게 하고 NEO-PTC-01에 의해 인식되는 에피토프를 확인한다. 어세이를 수행하기 위해서, NEO-PTC-01을 해동하고, 세척하고, pMHC 멀티머 및 CD8, CD4, CD14, CD16, 및 CD19를 포함하는 표면 마커의 패널로 염색시킨다. CD4-/CD14-/CD16-/CD19-, CD8+, pMHC+ T 세포의 분율은 유세포측정으로 정량된다. CD4+ T 세포 반응을 확인하는데 이용가능한 pMHC 멀티머 시약은 존재하지 않는다. 그러므로, 항원 리콜 어세이가 이 분석에 사용된다.

[0815] **항원 리콜 어세이**

[0816] 24시간 리콜 어세이와 조합한 유세포측정을 사용하여 NEO-PTC-01 중 네오항원 특이적 CD4+ T 세포 반응의 수 및 규모를 비롯하여 유도된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 다기능성 프로파일을 평가한다. NEO-PTC-01은 환자 특이적 펩티드가 로딩되거나 또는 그렇지 않은 수지상 세포와 공배양된다. 24시간 후에, 세포 생성물은 2개 어세이 출력을 사용해 특징규명된다: ● 유세포측정은 음성 대조군과 비교하여 표적 항원의 존재 하에서 CD4+ T 세포 상에 IFNγ 및/또는 TNFα의 증가된 발현으로서 정의되는, 네오항원 특이적 CD4+ T 세포 개체군을 확인하는데 사용된다. ● 유세포측정은 네오항원 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 다기능성 프로파일을 평가하는데 사용된다. 다기능성 프로파일은 음성 대조군과 비교하여 표적 항원의 존재 하에 IFNγ, TNFα, 및/또는 CD107a의 증가된 발현으로 정의된다. CD8+ 반응성 상황에서, 네오항원 특이적 세포는 CD8+ pMHC+ T 세포에서 프리-게이팅되고, 그 이후에 다기능성이 평가된다.

[0817] **자기유래 종양의 인식**

[0818] 자기유래 종양 세포에 노출 시 기능성 T 세포의 검출은 항원-특이적 T 세포가 존재하고 종양 세포 표면 상에 제시된 항원의 수준에 민감하다는 것을 결정하는데 사용된다. 이 어세이는 환자로부터 유래된 자기유래 종양 분해물을 사용한다. NEO-PTC-01은 자기유래 종양 세포와 4시간 동안 공배양된다. 음성 대조군 (NEOPTC-01 단독)과

비교하여 표적 항원의 존재 하에 IFNɣ, TNFα, 및/또는 CD107a의 증가된 발현은 자기유래 종양을 인식할 수 있는 NEO-PTC-01 중 T 세포의 확인을 허용한다.

[0819] **세포독성 어세이**

[0820] 펩티드-로딩 또는 안정하게 형질도입된 표적 세포를 사용한 세포독성 어세이는 항원-특이적 T 세포가 항원 인식 시 종양 세포를 사멸시킬 수 있다는 것을 확정한다. 어세이는 관심 항원을 비롯하여 관련 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 안정하게 발현하도록 조작될 수 있는 흑색종 종양 세포주, A375를 사용한다. NEO-PTC-01은 6시간 동안 A375 종양 세포와 공배양되고 이후에 세포독성은 CD8+ T 세포 상에서 CD107a의 탈과립화 및 초기 아폽토시스 마커인, 종양 세포 상의 활성 캐스파제 3의 상향조절을 통해 측정된다.

[0821] 표 17은 예시적인 출시 검사 및 사양을 도시한다. 표 18은 제품의 예시적인 특징규명을 표시한다.

표 17 – 출시 검사 및 사양

	검사	방법	사양
정체 및 역가	총 유핵 세포 계측	혈구계측기	≥ 1.0 x 10^9 세포
	CD3+ 세포 정체	유세포측정	CD3+ 양성 : 총 세포 개체군 중 ≥ 40%
	세포 생존능	트립판 블루 배제	≥ 70%
	CD3+ 세포 분획	유세포측정	정량적 사양은 과정 개발 및 조작 실행 데이터 및 어세이 정량 데이터를 기반으로 확립된다.
순도 및 안전성	무균성	Bact Alert	성장없음
	내독소	Endosafe-Portable Test System (PTS) 시스템 (Charles River)	≤ 1.0 EU/mL 70 kg의 평균 대상체 체중 기반 사양. 대상체에게 투여되는 내독소의 최종 용량은 시간 당 환자 체중 kg 당 5.0 EU를 넘지않는다.
	마이코플라스마[a]	핵산 증폭 (NAT)에 의한 마이코플라스마 DNA 검출	비검출 (음성)
a. 마이코플라스마 샘플은 T 세포 유도 배양의 수확 시, 세포가 세포 세척 이전에 가장 길게 배양된 제조 단계에 채취된다. 그러므로, 이러한 제조 단계는 오염 검출 위험성과 관련해 최악의 경우를 의미한다. 약어: DNA = 데옥시리보핵산; ELISA = 효소-연결 면역흡착 어세이; PCR = 중합효소 연쇄 반응			

[0822]

[0823] 충전된 약물 제품 주입 봉투로 오염물 도입 위험성을 감소시키기 위해서, 출시 검사 샘플은 약물 물질 (최종 제제에 재현탁된 CD3+ T 세포) 제조 과정 단계에서 채취될 수 있다. 이 접근법의 예외는 T 세포 배양의 수확 시간에 채취되는, 마이코플라스마 검사를 위해 채취된 샘플이다. 이것은 세포가 세포 세척 전에 가장 길게 배양되는 제조 단계이다. 그러므로 이러한 제조 단계는 마이코플라스마 오염이 검출될 위험성과 관련되어 최악의 경우를 의미한다.

표 18 – 특징 규명 검사

과정 단계#	과정 단계	검사	목적
출발 물질	성분채집술 생성물	부피	환자 세포 조달의 일관성
		표현형	환자 세포 하위개체군의 생존능 결정 (마커는 CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD56, CD11c, 생/사멸을 포함)
		pMHC 멀티머 및 24 시간 리콜 어세이를 사용한 사전-존재 CD4+ 및 CD8+ 기억 반응의 존재 결정	확장 전 사전-존재 네오-항원 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 % 결정
		분화 상태	확장 전 성분채집술 생성물의 분화 상태 평가 (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD62L)
약물 제품 검사	최종 제제에 재현탁후	표현형	약물 제품 세포 아형 개체군의 생존능 결정 (마커는 CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD56, CD11c, 생/사멸을 포함)
		pMHC 멀티머 및 24 시간 리콜 어세이를 사용한 미경험 구획으로부터 CD4+/CD8+ 세포의 유도	환자마다의 미경험 구획으로부터 유도된 세포 개체군의 % 범위 및 생존능 결정
		pMHC 멀티머 및 24 시간 리콜 어세이를 사용한 사전 존재 CD4+ 및 CD8+ 기억 반응 확장	환자 마다 사전 존재 CD4+ 및 CD8+ 세포 확장의 % 범위 및 생존능 결정
		특이성	야생형 에피토프가 아닌 돌연변이체에 대한 독점적 또는 우선적 반응성에 의한 네오항원 특이성 입증으로 생성물 일관성 확립

[0824]

과정 단계#	과정 단계	검사	목적
		기능성	1) 펩티드-로딩된 표적 또는 네오항원-발현 종양주에 반응하는 CD4+ 및 CD8+ 네오항원 특이적 T 세포 반응의 다기능성 입증으로 생성물 일관성 확립 (IFNγ, TNFα, 41B-B, CD107) 2) (어세이가 이용가능하면) 조작된 세포주를 사용한 세포 사멸 입증으로 생성물의 일관성 확립

[0825]

표 19 - T 세포 치료제 약물 제품 안정성 검사 간격 및 검사

시점	어세이
T 초기	세포 계측, 생존능, 정체, 역가, 무균성, 내독소, 마이코플라스마
T1 M	세포 계측, 생존능, 정체, 역가, 무균성, 내독소
T3 M	세포 계측, 생존능, 정체, 역가
T6 M	세포 계측, 생존능, 정체, 역가, 무균성, 내독소

[0826]

[0827] **실시예 34 - 난소암을 갖는 환자에서 T 세포 요법 (상기 개시된 T 세포 치료제)의 사용을 위한 프로토콜**

[0828] 이 실시예는 플래티늄-감수성, 고등급 장액성 난소 암종을 갖는 환자에서 네오항원 활성화된 T 세포 요법 (이하 "T 세포 치료")에 제안된 개방-표지, 단일 부문, 제I상 연구를 기술한다.

[0829] **1차 목적**: 무증상성 재발을 경험한 플래티늄-감수성 질환을 갖는 전이성 난소암 환자에서 T 세포 치료제의 단일 치료적 주입의 안정성을 평가하는 것이다. **2차 목적**: (i) 고형 종양의 반응 기준 (RECIST) v1.1을 기반으로 무진행 생존으로 평가되는 항-종양 활성을 결정하는 것이다. (ii) 무-화학요법 간격, 처음 후속 요법까지 시간, 및 전체 생존으로 평가되는 항-종양 활성을 결정하는 것이다. **탐구적 목적**은 (i) T 세포 치료제로 처치 이전, 그 동안, 및 그 이후 말초 혈액 및 종양 생검에서 항원-특이적 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응을 포함한 세포 면역 반응의 평가를 통한 면역원성 특징규명. (ii) 주입된 세포의 클론 확장, 지속성, 및 표현형의 특징규명. (iii) 환자 반응과 탐구적 생체마커, 예컨대 PD-L1 발현, 체세포 돌연변이 로딩, 및 네오항원 로딩의 상호관련짓기를 포함한다.

[0830] *연구 설계: 용량 평가:*

[0831] T 세포 치료제, 자기유래 개인화, 네오항원-특이적 양자 T 세포 요법은 1회 이하의 사전 플래티늄-기반 요법으로 처치된 플래티늄-감수성, 고등급 장액성 나소암을 갖는 환자에게 투여될 것이다. 환자는 적어도 1주 간격으로 2회 측정에서 기준 수준의 적어도 2배로 CA125의 기록된 상승 후 등록될 것이다. 15명 환자가 치료를 완료할 계획이다. 연구는 1×10^{11} CD3+ 세포의 최대 용량까지, 용량 증량 형식으로 수행될 것이다. 정의된 최소 용량은 없다. 생성물의 개인화 속성의 결과로서, 세포 용량은 환자마다 다양할 것이다. 1×10^{11} CD3+ 세포의 최대 용량은 비슷한 제품 예컨대 TIL 요법을 기반으로 한다. TIL 요법을 사용한 현행 연구들에서, 환자는 광범위한 세포 용량을 수용하였고 세포 용량 및 임상 이득 간 임의의 명확한 연관성이 없었다. 주입된 세포는 환자마다 가변적으로 확장될 것으로 예상된다. 이러한 확장이 환자 체중 또는 신체 표면적과 관련된다는 증거가 없으므로, 고정 (flat-fixed) 용량 증량 계획이 적용되었다.

[0832] *치료:*

[0833] T 세포 치료제가 환자에게 투여를 위해 출시된 시점에, 그들은 반복 방사선촬영 평가를 겪을 것이고 2일 (-5일 및 -4일) 동안 시클로포스파미드 30 mg/kg/d 및 3일 (-3일, -2일, 및 -1일) 동안 플루다라빈 25 mg/m^2/d으로 사전-조건화 용법을 시작할 것이다. 0일에, T 세포 치료제가 단일 IV 주입으로 투여될 것이다. 1×10^{10}개의 CD3+ 세포의 초기 용량은 처음 3명 환자에서 평가될 것이다. 이 용량 수준으로 환자의 주입은 독성 평가를 위해 최소 2주까지 시차를 둘 것이다. 이 용량 수준에서 주입이 충분히 내약성이면, 제2 용량 수준 (3명 환자)은 1×10^{11}개의 CD3+ T 세포를 수용하게 될 것이다. 이러한 더 높은 용량으로 세포 주입은 독성 평가를 위해 최소 2주까지 시차를 둘 것이다. 1×10^{11}개의 세포의 주입이 3명 환자에서 충분히 내약성이면, 모든 후속 환자는 최대 1×10^{11}개의 세포를 수용할 것이다. 모든 치료는 입원환자 상황에서 투여된다. T 세포 치료제는 환자 기준에 따라 제조되었고 제조된 세포의 수에서 이종성일 것으로 예상된다. 제조된 용량이 용량 수준 1에서 1×10^{10}개 CD3+ 이상, 또는 용량 수준 2에서 1×10^{11}개 CD3+ 세포 이상이면, 표적 용량 수준을 나타내는 제조된 용량의 일부만이 제공될 것이다. 제조된 용량이 이들 표적 용량 수준 미만이면, 용량이 제공되지만, 환자는 DLT에 대해 평가 가능한 것으로 간주되지 않을 것이고 3+3 설계의 목적을 위해 교체될 것이다. 최대 내약 용량 (MTD) 정의: 허용되는 부작용이 존재하는 주입된 세포의 최고 용량.

표 20 – 용량 코호트

용량 코호트	림프고갈	용량 범위 (단일 정맥내 용량)
1	플루다라빈 + 시클로포스파미드	최대 1×10^{10} 총 CD3+ 세포
2	플루다라빈 + 시클로포스파미드	최대 1×10^{11} 총 CD3+ 세포

[0834]

[0835] *용량 범위*:

[0836] 최소 용량은 정의되지 않는다. 제품의 개인화 속성의 결과로서, 세포 용량은 환자마다 가변적일 수 있다. 1×10^{11}개의 CD3+ 세포의 최대 용량은 비슷한 제품 예컨대 TIL 요법을 기반으로 한다. TIL 요법에 의한 현행 연구는 환자가 광범위한 세포 용량을 수용하였고 세포 용량과 임상 이득 간 임의의 분명한 연관성은 없었다. 주입된 세포는 환자마다 가변적으로 확장될 것으로 예상된다. 이러한 확장이 환자 체중 또는 신체 표면적과 관련된다는 증거가 없으므로, 고정 용량 증량 계획이 적용되었다. 1×10^{10}개의 CD3+ 세포가 처음 3명 환자에서 평가된다. 이 용량에서 주입이 충분히 내약성이면, 후속 환자는 최대 1×10^{11}개의 CD3+ 세포를 수용하게 된다.

[0837] *용량 제한 독성 (DLT):*

[0838] 용량 제한 독성의 정의는 다음과 같다: 등급 3 이상의 독성은 세포 주입 후 24시간 이내에 발생한다 (세포 주입과 관련). 독성은 1000 mg의 경구 (PO) 아세트아미노펜의 2 용량 또는 2 mg의 경구 (PO) 클레마스틴의 2 용량으로 8시간 이내에 등급 2 이하로 가역적이지 않아야 한다. 등급 3 자가면역력. 독성은 10일 이내에 등급 2 자가면역 독성 이하로 반전되거나 또는 해결되어서는 안된다. 임의 등급 4 자가면역 독성. 임의 등급 3 이상의 비-혈액학적 독성.

[0839] 림프고갈 화학요법 용법 또는 보조 약물 투여로 인해 예상되는 독성은 DLT로 간주되지 않는다.

[0840] *사이토카인 방출 증후군 (CRS) 정의 및 치료*:

[0841] 사이토카인 방출 증후군은 키메라-항원 수용체 (CAR)-변형 T 세포 및 이중-특이적 T 세포 관여 항체에서 관찰된 면역계의 중증 독성이다. 이들 요법은 인상적인 임상 효능을 일으키지만 또한 주목할만하고 때때로 CRS의 중증 독성을 유도하는 초생리적 T 세포 활성화를 특징으로 한다. CRS는 T 세포 관여 및 증식과 연관된 사이토카인 상승으로 인한 염증성 증상의 집합체이다. 대부분의 경우에서, 이들 증상은 미열 및 근육통을 포함하고 그들은 또한 혈관 누수, 저혈압, 폐 부종, 및 응고병증이 수반되는 중증 염증성 증후군으로서 존재할 수 있다.

[0842] CRS 위험성이 임의의 면역-활성화 요법에 존재하지만, 출원인은 T 세포 치료제에 의한 CRS의 위험성은 극히 낮다는 견해를 갖는다. T 세포 치료제 세포 생성물은 유전자 변형되지 않고 T 세포는 초생리적 수준으로 기능하도록 자극, 활성화, 또는 조작되지 않는다. 물론, CRS는 TIL 요법에서 관찰되지 않았다.

[0843] CAR-T 세포 임상 연구로부터의 CRS 경험에 따라서, 출원인은 T 세포 주입 이후에 매일 말초 혈액 C-반응성 단백질, 페리틴, 및 IL-6을 측정하여 T 세포 주입 이후 CRS에 대해 모니터링한다. 중증 사이토카인-방출 증후군의 신속한 반전이 인터루킨-6-수용체 차단 항체 토실리주맙의 치료로 획득되었고 토실리주맙은 이 연구에서 중증 CRS의 관리에 도입될 것이다.

[0844] *안정성 심사 위원회 (SRC)*

[0845] SRC은 현장 조사자, 후원 의료 모니터, 연구 및 개발 후원 책임자, 및 적절하면 임시 구성원으로 구성된다. 세포 주입의 독성, 면역학적 효과, 및 항종양 효능을 확인하기 위한 신중한 평가가 연속적으로 수행될 것이다.

[0846] *연구 단계:*

[0847] (1) CA 125의 사전-스크리닝. 플래티늄-감수성 환자 (6개월 이상 동안 제1선 플래티늄 화학요법에 대한 임상 반

응으로 정의됨)는 3개월 마다 CA125 검사를 겪는다. 기준 CA 125 수준은 제1선 플래티늄 화학요법의 완료 후에 처음 6개월 이내에 기록된 최저값으로서 정의된다.

[0848] 무증상성 CA125 상승 시 스크리닝. 기전 수준의 적어도 2배의 CA125의 검출된 상승 시, 환자는 질환 부담 정도를 결정하기 위해 CT 스캔을 겪으며; 모든 스캔은 지역에서 검토되고 필요하면 중앙 검토는 보류된다. 적어도 하나의 측정가능한 질환 부위를 갖는 환자는 적격성을 결정하기 위해 스크리닝을 겪는다. 스크리닝 절차는 사전 암 요법 및 관련 수술, 동시 약물, 완전 신체 검사, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태 (PS), 생명 징후, 12-리드 심전도 (ECG), 및 임상 실험실 평가 (혈액학, 화학, 소변검사, 임신 검사, 갑상선 검사)를 포함한 완전한 의료 이력으로 이루어진다.

[0849] 생검 및 성분채집술을 포함한 전처치. 상기 기술된 바와 같은 스크리닝 기준을 충족하는 환자는 시험에 등록된다. 등록 이후에, 환자는 서열분석 및 개별화된 돌연변이 분석을 위한 조직을 수득하기 위해 스크리닝 14일 이내에 종양 생검 또는 외과적 절제를 갖게 된다. 종양 생검은 포르말린-고정, 파라핀-포매 (FFPE)되어야 하고, 병리학으로 평가하여 최소 30% 종양 세포를 함유해야 한다. 말초 혈액의 샘플은 인간 백혈구 항원 (HLA) 클래스 I 및 II 유형분류를 비롯하여 '정상' 조직 대조군으로서 제공하도록 동시에 수득될 것이다. DNA는 환자의 고유한 돌연변이 풍경을 확인하기 위해서 종양 및 정상 둘 모두로부터 생성시켜서 전체-엑솜 서열분석에 제출된다. 종양 RNA는 유전자 발현을 특징규명하기 위해 동시에 서열분석된다. 나머지 종양 조직은 또한 종양 마커 및 면역 세포 마커의 면역조직화학 분석에 제출된다. 전처치 동안, 환자는 또한 최소 6-혈액 부피의 성분채집술을 겪는다. 성분채집술로부터 단리된 T 세포 및 항원-제시 세포는 T 세포 치료 약물 제품의 생성에 사용된다.

[0850] T 세포 치료제 생성. T 세포 치료제의 생성은 종양 생검 및 성분채집술 이후에 12-16주 기간 동안 일어난다. 생성물, 자기유래 개인화, 네오항원-특이적 양자 T 세포 요법은 각각의 개별 환자 종양으로부터 유래된 네오항원성 펩티드가 로딩된 자기유래 항원-제시 세포로 생체외에서 확장된 CD3+ T 세포로 이루어진다. 네오항원성 펩티드는 그들이 각 환자의 종양 내 돌연변이의 서열 분석을 기반으로 설계되므로 환자에 고유하고 환자 종양 세포에 특이적이다.

[0851] 치료

[0852] 환자의 T 세포 제품이 출시되는 시점에, 그들은 반복 방사선촬영 평가를 겪고, 2일 (-5일 및 -4일) 동안 시클로포스파미드 30 mg/kg/d 및 3일 (-3일, -2일, 및 -1일) 동안 플루다라빈 25 mg/㎡/d으로 사전-조건화 용법을 시작한다. 0일에, T 세포 치료제는 IV 주입으로 투여된다. 1 x 10^{10}개의 CD3+ 세포의 초기 표적 용량은 처음 3명 환자에서 평가된다. 환자는 독성을 평가하기 위해서 1 x 10^{10}개의 세포를 수용한 처음 3명 환자에서 최소 2주까지 시차를 두게 된다. 이 용량 수준에서 주입이 충분히 내약성이면, 제2 용량 수준으로 환자는 1 x 10^{11}개의 CD3+ 세포를 수용한다. 이러한 더 높은 용량에서 세포 주입은 독성을 평가하기 위해 1 x 10^{11}개의 세포를 수용한 처음 3명 환자에 대해 최소 2주까지 시차를 두게 된다. 1 x 10^{11}개의 세포의 주입이 3명 환자에서 충분히 내약성이면, 모든 후속 환자는 1 x 10^{11}개의 세포까지 0일에 T 세포 치료제의 단일 주입을 수용한다. 모든 치료는 입원 환자 상황에서 투여된다. T 세포 치료제는 환자 기준에 따라 제조되고 용량 내 이종성일 것으로 예상된다. 제조된 용량은 용량 코호트 1에서 1 x 10^{10}개의 CD3+ 이상 또는 용량 코호트 2에서 1 x 10^{11}개의 CD3+ 세포 이상이면, 용량 표적 수준을 나타내는 제조된 용량의 일부만이 제공된다. 제조된 용량이 이러한 표적 용량 수준 미만이면, 그 용량이 제공되지만, 환자는 DLT에 대해 평가가능한 것으로 간주되지 않고 3+3 설계의 목적을 위해 교체된다. 1일에 시작하여, 필그라스팀은 5 mcg/kg/일 (300 mcg/일을 초과하지 않음)의 용량으로 피하로 투여된다. 필그라스팀 투여는 호중구 계측치 > 1.0 x10^{9}/L X 3일 또는 > 5.0 x10^{9}/L일 때까지 매일 계속된다. 12-16주 생성 기간 동안, 환자가 즉각적 요법을 요구하는 무증상성 진행을 경험하면, 그들은 연구에 남을 수 있고 임상적으로 적절하면 기준선 보다 CA 125 2X 상승으로 기록되어 제2 재발 시점에 T 세포 치료제를 받는다.

[0853] *추적 검사*

[0854] 이 연구의 1차 치료기는 1주 내지 52주이다. 1차 치료기 동안 수행된 안전성 평가는 유해 사례 (AE) 수집, 증상-관리 신체 검사, 생명 징후의 측정, ECOG PS, 및 안전성 실험실 평가를 포함한다. 치료에 대한 반응을 평가하기 위한 방사선촬영 평가는 12주, 24주 및 48주에 수행된다. 필그라스팀 투여 후 대략 4-6주에, 환자는 완전한 종양 평가 및 독성 및 면역학적 매개변수의 평가를 겪는다. 환자는 이 프로토콜 중에 다른 실험 작용제를 수용하지 않는다. 종합적인 면역 모니터링을 위해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 4시간, 4일, 14일, 1개월, 및 이후

1개월마다의 시점에 T 세포 치료제 주입 후에 80-120 cc 말초 혈액 채취로 수득된다. 치료 전 생검이외에도, 핵심 또는 외과적 생검은 20주 내지 24주 및/또는 질환 진행 시점에 수행되어야 한다.

[0855] **실시예 35 - 전이성 흑색종의 양자 세포 요법을 위한 자기유래 네오항원-특이적 T 세포 생성물의 개발**

[0856] *확장가능한 과정 조작, T 세포 제조, 및 품질 관리*

[0857] 이 실시예에서, 전이성 흑색종 환자로부터 백혈구성분채집술을 사용한 다수의 성공적인 과정 조작 실행의 결과가 도시된다. NEO-STIM은 사유 생체외 유도 과정이고, 각각의 개별 환자의 종양으로부터의 다수 네오항원을 표적화하는 고도로 특이적인 T 세포 반응을 함유하는 네오항원-특이적 T 세포 생성물 (NEO-PTC-01)을 생성시켰고; 이들 T 세포 반응은 다기능성이고 자기유래 종양을 인식할 수 있다. 임상 시험 프로그램은 여기에 기술된 과정을 사용하여 착수된다. NEO-PTC-01에서 임상 프로그램에 대한 일반화된 작업 흐름은 도 1A 및 67에 도식적으로 표시된다. 이 프로그램의 예상 장점은 도 67에 요약된다.

[0858] 다수의 네오항원-특이적 T 세포 반응을 프라임, 활성화, 및 확장시키는, 유도 과정, NEO-STIM™이 기술된다. 약물 제품 NEO-PTC-01의 특징 - 특이성, 기능성, 및 표현형 -은 임상 이득을 부여하고, 제한없이 항원 탈출 위험성 감소, 표적-외 독성 위험성의 감소, 지속성 및 종양 세포 사멸을 구동하기 위한 최적 T 세포 표현형 선택, 고형 종양 전반에서 광범위 임상 기회 포괄, 비-조작된 세포 생성물이 제한된 독성 기대를 갖고 생성된다는 장점의 이용을 포함하여, 다른 세포 요법 양식이 직면하는 도전을 극복할 것으로 예상된다. 네오항원-특이적 T 세포 생성물 (NEO-PTC-01)은 각각의 개별 환자의 종양으로부터 다수 네오항원을 표적화하는 고도로 특이적인 T 세포 반응을 함유하여 생성되었고; 이들 T 세포 반응은 다기능성이고 자기유래 종양을 인식할 수 있다.

[0859] 4개 과정 조작 실행은 IRB 승인 하에 수득된 건강한 공여자 및 3명 흑색종 환자 샘플로부터의 PBMC를 사용하여 NKI-AVL (Biotherapeutics Unit of Netherlands Cancer Institute - Antoni van Leeuwenhoek)가 수행하였다 (표 22).

[0860] 흑색종 환자 경우에, 환자-특이적 네오항원은 T 세포 에피토프 예측 프로그램을 사용해 예측되었다. HD108의 경우, 사전 확인된 네오항원 및 공여자 HLA 대립유전자에 제한된 모델 항원은 NEO-STIM을 실행하는데 사용되었다. 합성 펩티드는 8 내지 25 aa 길이로 생성되었다. NEO-STIM은 용기 당 초대 50 x 10^6개의 PBMC를 사용하여, 기억 및 신생 T 세포 반응을 프라임, 활성화, 및 확장시키는데 사용되었다.

[0861] 이들 네오항원-특이적 T 세포의 특이성, 표현형, 및 기능성은 하기 어세이로 이들 반응을 특징규명하여 분석하였다:

[0862] ■ pMHC 멀티머를 사용한 조합 코딩 분석.

[0863] ■ 상세한 흐름 특징규명. 마커는 CD3, CD4, CD8, CD45RA, 및 CD62L를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0864] ■ a) $CD4^+$ T 세포 반응을 확인 및 검정하고, b) $CD8^+$ 및 $^{CD}4^+$ T 세포 반응의 다기능성을 평가하고, c) 자기유래 종양을 인식하는 능력을 평가하기 위해 다중복합, 다수매개변수 유세포측정을 사용한 리콜 반응 어세이. 프로-염증성 사이토카인 IFN-ɣ 및 TNFα, 및 탈과립화 마커로서 CD107a의 상향조절을 측정하였다.

[0865] ■ 천연적으로 프로세싱되고 제시되거나 또는 외생적으로 로딩된 항원에 반응하여 표적 세포를 인식하고 사멸하는 네오항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 반응의 능력을 이해하기 위해서 네오항원-발현 종양주를 사용한 세포독성 어세이.

[0866] *결과*

[0867] NEO-PTC-01, 양자 T 세포 치료제 생성물의 제조를 알리기 위한 전임상 개발 활동은 건강한 공여자 및 3명 전이성 흑색종 환자로부터 백혈구성분채집술을 사용하여 4회 과정 조작 실행의 실시를 성공적으로 하였다.

[0868] 생성된 최종 약물 제품은 모든 4회 과정 조작 실행에 대한 출시 사양을 충족하였다 (표 21).

표 21 – 허용 기준을 충족하는 약물 제품의 결과

모든 실행에서 NEO-PTC-01에 대한 허용 기준	
검사	**결과**
세포 계측	통과
생존능	통과
T 세포 순도/정체 ($CD3^+$ 세포)	통과
마이코플라스마	통과
내독소	통과
무균성	통과

[0869]

[0870] 대부분의 최종 약물 제품은 $CD3^+$ T 세포 (범위: 67.4% 내지 90%)로 이루어졌다. B 세포, NK 세포, 및 APC가 비-$CD3^+$ 분율을 구성하였다 (도 68).

[0871] 19 $CD8^+$ 및 25 $CD4^+$ T 세포 반응이 PBMC로부터 유도되었다 ($CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포의 경우, 각각 환자 당 범위 4-5 및 4-7, 표 22, 도 69A-69C). 흑색종 환자로부터의 PBMC에서 유도된 모든 T 세포 반응은 신생 T 세포 반응으로 가정되고; 사전 존재 반응은 미조작된 출발 물질에서 검출되지 않았다. 이것은 또한 건강한 공여자로부터의 PBMC도 마찬가지 경우지만, 확인된 반응 중 하나는 말초 혈액 중 높은 전구체 빈도를 갖는 것으로 알려진 MART1을 향하였다. 이와 같이, 이 과정은 미경험 구획으로부터 T 세포 반응을 성공적으로 유도하였다. 추가로, 건강한 공여자에서 높은 전구체 빈도를 갖는 것으로 알려진 T 세포 반응이 확장되었고, 이것은 기억 T 세포 반응의 확장을 닮았다.

표 22 – 조작 실행의 유도를 위한 설계

실행 ID *물질 공급원*	**유도된 $CD8^+$ 반응**	**유도된 $CD4^+$ 반응**
시험 실행 *건강한 공여자*	$REL_{G>R}$, $ZDBF2_{P>L}$, $KXD1_{S>F}$, MART1 & SNA70	$PRKDC_{E>K}$, $MERTK_{E>K}$, $CDK4_{R>C}$, $GAS7_{H>Y}$, $RQDC1_{P>L}$, HIV1 & HIV2
흑색종 환자 1	$ZNF226_{H>Y}$, $LRBA_{S>L}$, $DNM2_{I>V}$, $BBS4_{L>F}$, & $GTF2H3_{V>A}$	$PRKDC_{E>K}$, $MARCH7_{S>F}$, $TRAK2_{G>V}$, $RANBP9_{P>S}$, $DNM2_{I>V}$, $MERTK_{E>K}$, $OSBPL8_{L>S}$
흑색종 환자 2	$TENM3_{S>L}$ (10 량체), $CERK_{P>S}$, $ITPR3_{E>K}$, $TENM3_{S>L}$ (9 량체) & $ATP2C1_{E>K}$	$TENM3_{S>L}$, $ARID2_{S>L}$, $ATP2C1_{E>K}$, $CERK_{P>S}$, $ATP5G2_{S>F}$, $TNFRSF10B_{P>L}$, & $ALG13_{G>R}$
흑색종 환자 3	$REL_{G>R}$, $PDE8A_{P>S}$, $WWP2_{P>S}$ & $VANGL2_{S>F}$	$ACACA_{H>Y}$, $MYCBP2_{S>F}$, $ALS2_{A>T}$ & $TOR1AIP1_{T>I}$

[0872]

[0873] 추가 특징규명을 수행하여 NEO-STIM-유도된 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포의 다기능성 프로파일 및 분화 상태를 평가하였다. 돌연변이체 펩티드-로딩된 DC로 재-챌린지 시에, 네오항원-특이적 T 세포는 1, 2, 및/또는 3 기능을 나타냈다 ($CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포 반응의 다기능성 프로파일의 예는 각각 도 69C 및 도 70 아래 패널에 도시됨). 도 70 위 패널은 대표적으로 유도된 반응에서 IFN-γ 및/또는 TNF-α을 발현하는 $CD4^+$ 세포의 분율을 나타내는 대표적

인 데이터를 입증한다. 위 우측 패널은 IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T 세포의 예시적인 유세포측정 그래프를 표시하는 대표적인 데이터를 도시한다. 추가로, 약물 제품의 분화 상태를 평가하였다. 대부분의 NEO-STIM-유도된 T 세포는 이펙터 기억 및 중심 기억 표현형이었다 (도 71).

[0874] NEO-STIM-유도된 T 세포 반응은 돌연변이체 에피토프에 고도로 특이적인 것으로 확인되었다. 유도된 CD8$^+$ 및 CD4$^+$ T 세포 반응의 특이성을 평가하였고 2개 범주로 지정하였다 (도 72): (i) 돌연변이체 반응성 및 (ii) 야생형 교차-반응성. 돌연변이체 반응성 범주는 (a) 야생형, 에피토프가 아닌, 돌연변이체 에피토프에 대해 IFN-γ 및/또는 TNFα의 유의한 증가를 보이는, 돌연변이체-특이적; 및/또는 (b) 돌연변이체 및 야생형 에피토프에 대해 IFN-γ 및/또는 TNFα의 유의한 증가를 보이는 돌연변이체-선택적. 그러나, 돌연변이체 에피토프에 대한 신호가 야생형 에피토프와 비교하여 유의하게 더 높다. 야생형 교차-반응성 범주는 돌연변이체 및 야생형 에피토프에 대한 IFN-γ 및/또는 TNFα의 유의한 증가를 보인다. 2개 신호 간 유의한 편차는 없다. 요약: CD4$^+$ 구획의 경우, T 세포 반응이 양쪽 범주에서 검출되었고; CD4$^+$ T 세포의 85%는 돌연변이체-반응성이고 15%는 야생형 에피토프와 교차-반응성이었다. CD8$^+$ T 세포 구획의 경우, 모든 T 세포의 100%는 돌연변이체-반응성이었다 (표 23).

표 23 – 모든 검사된 반응의 요약, 터키 검정을 사용해 지정된 유의성, $P < 0.05$

시험 실행, ENG-01 & ENG-02			
	시험된 반응	돌연변이체 반응성	야생형과 교차 반응성
CD4	13	85%	15%
CD8	3	100%	0%

[0875]

[0876] 마지막으로, NEO-STIM-유도된 T 세포의 세포독성 능력은 확인된 T 세포 반응의 서브세트에 대해 평가되었다. 연구된 돌연변이뿐만 아니라 공여자-특이적 HLA 대립유전자를 발현하는, 형질도입된 종양 세포주가 시험 실행 및 ENG-01을 위해 생성되었다. ENG-02 경우, 공여자-특이적 HLA 대립유전자를 발현하는 펩티드-로딩된 종양 세포가 사용되었다 (도 73):

[0877] i. $REL_{G>R}$ (시험) 및 $LRBA_{S>L}$ (ENG-01)에 대한 CD8$^+$ T 세포 반응은 CD8$^+$ T 세포 상에서 CD107a 및 공배양 이후에 돌연변이체 구성체가 형질도입된 종양 세포 상에서 활성 캐스파제3의 유의한 상향조절을 보였다.

[0878] ii. $TENM3_{S>L}$ 및 $ITPR3_{E>K}$ (ENG-02)에 대한 CD8$^+$ T 세포 반응은 종양 세포 상에서 활성 캐스파제3의 유의한 상향조절, 및 $TENM3_{S>L}$의 경우에, 펩티드-로딩된 종양 표적화 공-배양 이후, CD8$^+$ T 세포 상에서 CD107a의 상향조절을 보였다.

[0879] 중요하게, ENG-01 및 ENG-02로부터 생성된 T 세포와 입수가능한 자기유래 종양 분해물의 공배양은 IFN-γ$^+$ 및 CD107a의 상향조절을 기반으로, 자기유래 종양 세포를 직접 인식할 수 있었다는 것을 증명하였다 (도 74).

[0880] 이러한 예시적인 유도 과정을 사용하여, 강력한 T 세포 생성물은 치료적 규모로 흑색종 환자의 PBMC로부터 재현 가능하게 생성될 수 있다. 유도 과정은 다수의 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응을 유도한다. 유도된 T 세포 반응은 돌연변이체-반응성이고, 다기능성 프로파일을 보이며, 중심 및 이펙터 기억 표현형을 갖는다. 유도된 T 세포 반응은 항원-발현 종양 세포주의 인식 시 세포독성 기능의 상향조절로 확인되는, 세포독성 능력을 갖는다. 중요하게, 유도된 T 세포 배양물은 자기유래 종양을 직접적으로 인식할 수 있다.

[0881] *임상 적용*

[0882] 규모확장 제조된 T 세포의 예시적인 임상 적용은 제한없이 흑색종, 폐암, 췌장암, 교모세포종, 난소암의 치료를 포함한, 본 명세서에 개시된 임의의 임상 적용일 수 있다.

[0883] 임상 시험을 개시하기 위한 프로그램에서 또 다른 적용은 도 75에 요약된다. 이러한 적용에서, 환자는 2개 코호트에 포함된다. 코호트 A: 항-PD1 치료에 불응성이고 항-CTLA-4 요법을 받은 환자. 이들 환자는 상기 기술된 약물 제품의 2개 용량을 겪는다. (i) 적은 수의 환자는 10^8-10^9 세포 단일요법을 받을 것이고, 적은 수의 환자

는 >10^9-10^10 세포를 받는다. 코호트 B: 코호트 A에서 결정된 용량으로 항-CTLA4 존재 또는 부재에서 항-PD1에 대해 3개월에 안정하거나 또는 무증상성 진행자인 환자의 포함.

[0884] **실시예 36: 진행성 또는 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 NEO-PTC-01의 개방 표지, 제I상 연구**

[0885] 이 연구는 생체외에서 제조되고 종양 및 종양 미세환경에서 전시되는 네오항원을 표적화하는 양자 세포 요법을 위한 자기유래 개인화 T 세포 제품인, NEO-PTC-01을 조사한다. 네오항원은 환자의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 및 클래스 II 대립유전자의 상황에서 존재하는 DNA 중 돌연변이로 유래된 종양-특이적 항원이다. 네오항원 표적화는 개별화된 접근법을 이용하여 각 환자에 대한 개인화된 T 세포 생성물을 생성시키기 위해 각 세포 생성물의 조성을 재단할 기회를 제공한다. 생성물로부터 유래된 세포는 중심 또는 이펙터 기억 표현형일 것으로 예상되어, 다수 기능을 수행할 수 있고 (예상 작용 기전은 표적 세포의 인식 시 사이토카인 생성 및 탈과립화를 포함) 야생형 에피토프와 비교했을 때 고도로 돌연변이체 특이적일 것으로 예상된다. 이러한 NEO-항원 특이적 양자 T 세포 요법의 첨가는 보다 내구성있는 항-종양 반응, 증상 관리, 및 장기간의 종양 무진행을 포함하여, 체크포인트 억제제 SOC 요법에 비해 유의한 임상적 이득을 제공할 수 있다.

[0886] 연구의 목적

[0887] 이 연구의 1차 목적은 절제불가 또는 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 NEO-PTC-01의 안전성을 평가하고 최고 내약성 용량을 결정하는 것이다. 연구의 2차 목적은 1) 고형 종양의 반응 기준 (RECIST) v1.1 (Eisenhauer, 2009)을 기반으로 무진행 생존으로 평가하여 항종양 활성을 결정하고, 2) 전체 반응률 (ORR), 반응 지속기간 (DOR), 및 임상 이득률 (CBR)을 평가하여 항종양 활성을 결정하는 것이다.

[0888] 연구 설계

[0889] 연구 NTC-001은 절제불가 또는 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 NEO-PTC-01의 안전성 및 활성의 제1상 조사이다. 연구는 2개 파트, 파트 1 (용량-결정) 및 파트 2 (용량 확장)로 수행된다. 연구의 용량-결정 파트는 ≥ 1x10^8 내지 ≤ 1x10^9 세포의 용량에서 NEO-PTC-01 요법을 개시하고 3+3 용량 증량 설계에 따라서 계속된다. 용량 확장 파트 2는 안전성 및 내약성을 더욱 정의하기 위해서 확장된 환자 코호트에서 최고 내약성 파트 1 용량을 검사한다.

[0890] 연구 개체군

[0891] PD-1/PD-L1 억제제 및 CTLA-4 억제제 둘 모두가 치료되었지만 진행된 절제불가 또는 전이성 흑색종을 갖는 18세 내지 75세의 성인 남성 및 여성 (파트 1).

[0892] 중재술

[0893] 연구 파트 1의 환자는 ≥ 1x10^8 내지 ≤ 1x10^9 세포의 용량으로 시작하여 NEO-PTC-01을 받는다. 파트 2의 환자 (확장 코호트)는 파트 1로부터의 최고 내약성 용량에서 NEO-PTC-01을 받는다.

[0894] 1차 연구 매개변수/연구 결과

[0895] 주요 연구 매개변수는 유해 사례 (AE)의 발생, 중증 유해 사례 (SAE), 및 안전성 실험실값 변화, 신체 검사, 및 생명 징후를 기반으로 NEO-PTC-01에 의한 치료의 안전성 평가이다. 치료에 대한 임상 반응은 치료에 대한 반응 및 질환의 진행 (RECIST v1.1)을 결정하기 위해 일련의 방사선촬영 평가 (컴퓨터 단층촬영 [CD] 또는 자기 공명 영상법 [MRI])에 따라 평가된다.

[0896] 2차 연구 매개변수/연구 결과

[0897] 치료에 대한 임상 반응은 치료에 대한 반응 및 질환의 진행 (RECIST v1.1)을 결정하기 위해 일련의 방사선촬영 평가 (컴퓨터 단층촬영 [CT] 또는 자기 공명 영상법 [MRI])에 따라 평가된다. CR 또는 부분 반응 (PR)을 획득한 환자의 비율로서 정의되는 전체 반응률 (ORR)을 결정한다. PFS는 NEO-PTC-01의 최초 투약일로부터 진행성 질환 (PD) 또는 사망이 최초 기록된 날까지의 시간으로서 정의된다. DOR은 확인된 반응의 최초 기록날에서 최초 기록 PD의 날로서 정의된다. 임상적 이득율 (CBR)은 RECIST 기반으로 CR, PR, 또는 SD를 획득한 환자의 비율로서 정의된다. 최초 후속 요법까지 시간은, 최초 투약일로부터 최초 후속 요법의 시작날까지의 시간으로서 정의된다. 참여, 이득, 및 그룹 관련성과 연관된 부담 및 위험성의 속성 및 정도.

[0898] NTC-001은 절제불가 또는 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 NEO-PTC-01의 용량 결정 및 안정성 인간 최초 (FIH) 연구이다. 연구의 용량-결정 파트는안전성 평가의 초기 시기에 연구 약물에 노출을 제한하는, 3+3 용량 증량 설

계에 따라 구조화된다. 추가 안전성 예방 조치로서, 용량 코호트 내에서, 최초 3명 환자의 등록은 최소 2주 간격에서 시차를 두게 된다. 주요 위험 영역은 림프구고갈 기간 동안 감염, 사이토카인 방출 증후군 (CRS)의 가능성, 및 종양-외, 표적-외 독성을 포함한다. 추가의 잠재적 위험은 종양 생검 및 백혈구성분채집을 포함한, 다른 연구-특이적 절차와 연관된 것들이다. 환자는 림프구고갈의 최초 치료기, T 세포 생성물 주입, 및 호중구 회수 동안 입원환자 모니터링을 위해 입원한다. 이후에, 매주 임상 검사 및 실험실 모니터링이 퇴원 후 1주 내지 4주 간 외래 환자 상황에서, 이후에 나머지 연구 동안 6주마다 방문 시에 수행된다. 안전성 중재술은 시클로포스파미드 + 플루다라빈 림프구고갈 용법, 및 사이토카인 방출 증후군 (CRS) 모니터링 및 관리 이후에 필그라스팀 성장 인자 지원을 포함한다. 종양 침윤성 림프구 (TIL)-기반 요법에 의한 이전 연구는 가장 관련있는 비교 요법일 수 있다. 이들 연구는 이 연구의 출발 용량 및 용량 범위를 고안하는데 고려된다. 낮은 출발 용액이 환자에서 초기 NEO-PTC-01 검사를 위한 핵심 안전성 고려사항으로서 구현된다. 종양 생검으로부터의 평가는 이 연구의 이유 및 설계에 핵심적이다. 실현가능한 경우마다, 연구 설계는 기준 종양 표본에 대한 저장 샘플의 사용을 허용한다. 주입후 종양 생검 및 백혈구성분채집술 샘플은 인간 최초 연구에서 독성 및 효능과 상관성을 포함하여, 안전성 및 약력학적 효과를 평가하기 위해 필요하다. 이들 절차는 병원-모니터링 상황에서 기관 표준 또는 프로토콜에 따라 수행된다. 이들 위험성은 절제불가 또는 전이성 흑색종을 갖는 환자 및 요법 전 질환 진행 또는 최적하 반응 (파트 2)에서 잠재적 NEO-PTC-01 임상 이득과 관련하여 고려한다. NEO-PTC-01은 신규한, 개별화된 치료 접근법을 대표하고; 네오항원-특이적 자기유래 T 세포 요법의 첨가는 체크포인트 억제제 요법에 비해 유의한 임상 이득을 제공할 수 있다.

[0899] 주요 포함 기준

[0900] 1. 서면 정보 동의서를 제공할 의사 및 능력이 있는 성인 (18세 내지 75세) 남성 및 여성.

[0901] 2. 조직학적으로 확인된 절제불가 또는 전이성 흑색종.

[0902] 3. 파트 1:

[0903] a. PD-1/PD-L1 억제제 (단일 작용제로 또는 병용하여) 및 CTLA-4 억제제 함유 요법 (단일 작용제 또는 병용물)을 이전에 받았다.

[0904] b. 그들 마지막 치료 용법 시 질환 진행이 기록되었다.

[0905] 4. 파트 2:

[0906] a. PD-1/PD-L1 억제제 (단일 작용제로서 또는 CTLA-4와 병용하여)를 적어도 3개월 동안 받았고/현재 받고있다.

[0907] b. 등록 3개월 이내에 수행되어야 하는, 가장 최근의 영상화 평가 시에 임상적으로 무증상성 진행성 질환 또는 RECIST 1.1에 따라 안정한 질환이 기록되었다.

[0908] c. PD-1/PD-L1 억제제 요법을 계속하는 것이 의학적으로 적합하다.

[0909] d. 조사자의 견해에 따르면 T-세포 기반 요법의 첨가로 이득을 얻을 수 있다.

[0910] 5. BRAF 돌연변이체 환자의 경우: 환자는 또한 이전에 표적화 요법 (B-raf 억제제 또는 B-raf/MEK 병용 요법)을 받았다.

[0911] 6. 환자는 임상적으로 무증상성이어야 하고 적어도 16주 동안 항신생물성 치료를 요구하는 증상없이 유지될 것으로 예상된다.

[0912] 7. RECIST v1.1에 따른 적어도 하나의 측정가능한 질환 부위를 갖는다.

[0913] 8. 적어도 하나의 질환 부위는 종양 조직에 대한 생검으로 접근가능해야 한다. 전처치 생검의 경우, 생검이 등록 6개월 이내에 수행되었으면 저장 표본을 사용할 수 있다.

[0914] 9. 0 또는 1의 ECOG 수행 상태를 갖는다.

[0915] 10. 안전성 위험으로 고려되지 않는 독성 (예를 들어, 탈모)을 제외하고, 허용되는 기준 상태 (실험실 독성 경우 하기 포함 제한 참조) 까지 또는 유해 사례에 대한 국립 암센터 공통 용어 기준 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events) (NCI CTCAE) 버전 5.0에 따른 0 또는 1의 등급 까지, 사전 치료와 연관된 모든 독성으로부터 회복된다.

[0916] 11. 실험실값 스크리닝은 하기 기준을 충족해야 하고 연구 치료 이전 28일 이내에 수득되어야 한다:

[0917] a. 백혈 세포 (WBC) 계측치 ≥ 3x 10^3/L

[0918] b. 절대 호중구 계측치 (ANC) ≥ 1.5 x 10^3/㎕

[0919] c. 혈소판 계측치 ≥ 100 x 10^3/㎕

[0920] d. 헤모글로빈 > 9 g/dL 또는 6mmol/L

[0921] e. 혈청 크레아티닌 ≤ 1.5 x 정상 상한치 (ULN) 또는 크레아티닌 제거율 (CrCl) ≥ 50 mL/분 (콕크로프트-골트 (Cockcroft-Gault)에 의함)

[0922] f. 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) ≤ 3 x ULN

[0923] g. 총 빌리루빈 ≤ 1.5 x ULN (총 빌리루빈 < 3.0 mg/dL이 허용되는 길버트 증후군 환자 사례 제외)

[0924] h. PT 또는 aPTT가 항응고제의 의도적 사용의 치료적 범위 이내에 있는 한 환자가 항응고제 요법을 받지 않으면, 국제 정규화 비율 (IN R), 프로트롬빈 시간 (PT), 또는 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (aPTT) ≤ 1.5 x ULN

[0925] 주요 배제 기준

[0926] 1. 75세 초과 연령.

[0927] 2. 전이성 질환에 대해 3종 초과의 사전 요법을 받았다.

[0928] 3. 활동성 자가면역 질환 또는 이의 이력 (기지 또는 의심)을 갖는다. 백반, I형 진성 당뇨병, 오직 호르몬 대체만을 요구하는 자가면역 병태로 인한 잔류형 갑상선 저하증, 전신 치료가 필요없는 건선, 또는 외부 기폭제 부재하에서 재발이 예상되지 않는 병태는 예외가 허용된다.

[0929] 4. 기지의 활동성 중추 신경계 (CNS) 전이 및/또는 암종성 수막염을 갖는다. 이전에 뇌전이를 치료한 환자는 그들이 안정하고, 신규 또는 확대된 뇌 전이의 증거가 없고, 등록 전 적어도 7일 동안 스테로이드를 사용하지 않았으면 참여할 수 있다. 이러한 예외는 암종성 수막염은 포함하지 않고, 임상적 안정성과 무관하게 배제시킨다.

[0930] 5. 정맥내 항미생물 요법을 필요로 하는 활성동 전신 감염, 응고 장애 또는 심혈관, 호흡기 또는 면역계의 다른 활동성 주요 의학적 질병, 양성 스트레스 탈륨 또는 비슷한 검사로 입증되는, 심근경색, 임상적으로 유의한 심장 부정맥 예컨대 비제어적 심방세동, 심실 빈맥, 또는 2도 또는 3도 심장 차단, 및 폐쇄성 또는 제한성 폐질환.

[0931] 6. NEO-PTC-01 주입 이전 14일 이내에 코르티코스테로이드 (> 10 mg의 일일 프레드니손 당량) 또는 다른 면역억제성 약물에 의한 전신 치료를 필요로 하는 병태를 갖는다. 흡입 또는 국소 스테로이드 및 부신 대체 용량 (5 10 mg 일일 프레드니손 당량)은 활동성 자가면역 질환의 부재 하에서 허용된다.

[0932] 7. 기지의 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 활동성 만성 B형 또는 C형 간염, 및/또는 조사자 견해로, 이 연구의 참여를 방해할 수 있는 암과 미관련된 생명-위협적 질병.

[0933] 8. 조사자 견해로, 이 연구의 참여를 방해하게 되는, 임의의 기저 의학적 병태, 정신과적 병태, 또는 사회적 상태를 갖는다.

[0934] 9. 연구 참여를 방해하거나 또는 연구 데이터 분석 능력을 혼동시킬 것으로 예상되는 대수술이 계획되어 있다.

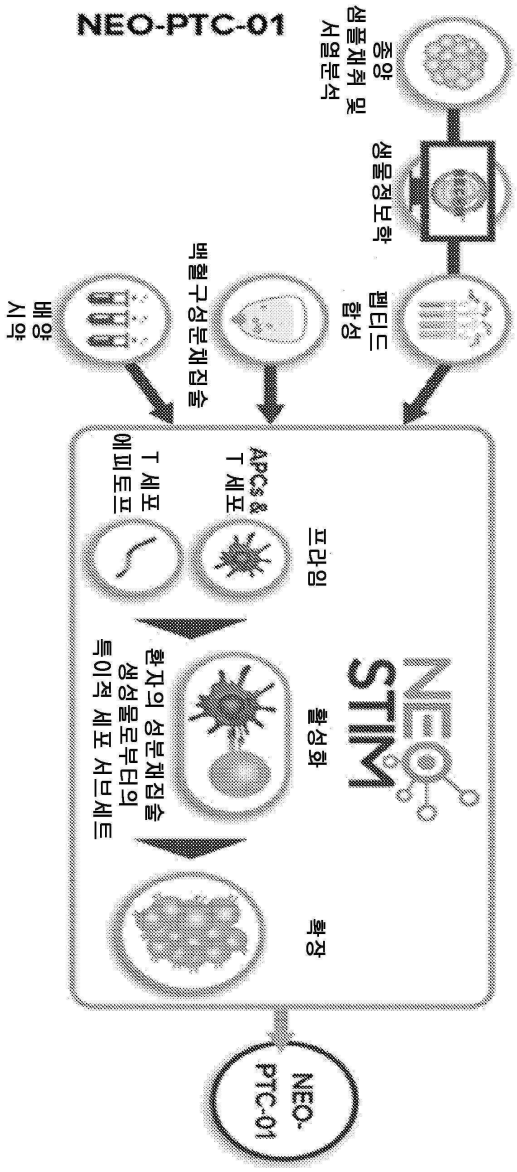
[0935] 10. 임신 또는 모유수유 중이거나, 또는 스크리닝 방문에서 시작하여 시험 종료 (E01") 이후 120일 방문까지, 계획된 시험 기간 동안에 임신 예정이거나 또는 출산예정인 경우, 이 연구에서 투여하려는 치료제로 모계 치료에 대한 속발성으로 육아중인 유아에게 미지의 잠재적인 AE 위험성이 존재하므로 육아 여성은 배제시킨다.

[0936] 11. 하기 상황을 제외하고, 흑색종 이외에 다른 침입성 악성종의 이력을 갖는다: a. 환자가 적어도 2년 동안 무질환이었고 조사자가 악성종의 재발 위험성이 낮다고 간주한다. b. 환자는 유방, 구강 또는 자궁경부의 정상소재 암종, 피부의 기저 세포 또는 편평 세포 암종에 대한 전신 화학요법으로 치료되지 않았다.

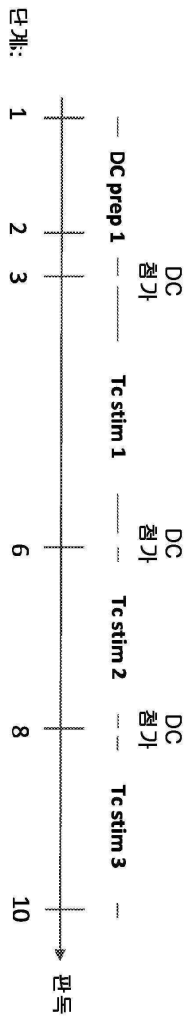
[0937] 용량 증량 파트 1의 환자는 표준 용법 이후에 질환 진행을 가지며, 표준 치료의 연기 또는 편차가 없다. 파트 2 환자 경우, NEO-PTC-01은 연속 CPI 요법과 제공된다.

도면

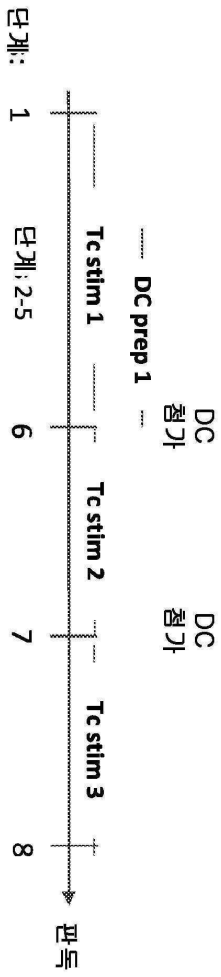
도면1a


NEO-PTC-01
중앙
샘플채취 및
시험분석
생물정보학
펩티드
합성
백혈구성분채집술
배양
시약
APCs &
T 세포
T 세포
에피토프
프라임
NEO
STIM
활성화
환자의 성분채집술
생성물로부터의
특이적 세포 서브세트
확장
NEO-
PTC-01

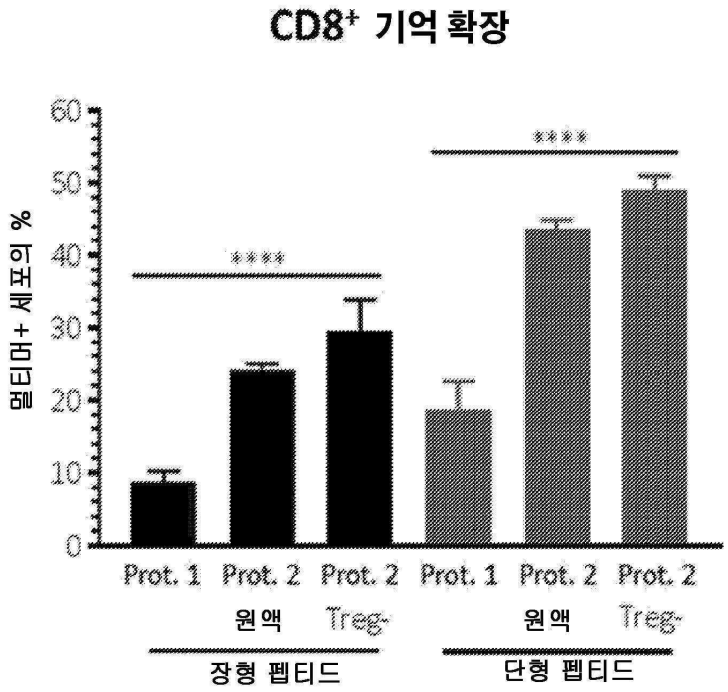
도면1b


단계:
1
2
3
6
8
10
DC prep 1
DC 첨가
Tc stim 1
DC 첨가
Tc stim 2
DC 첨가
Tc stim 3
판독

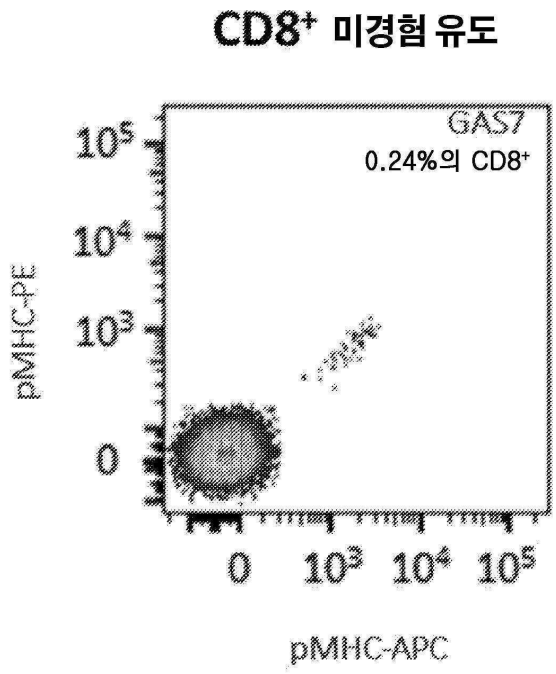
도면1c


단계:
1
단계; 2-5
6
7
8
Tc stim 1
DC prep 1
DC 첨가
Tc stim 2
DC 첨가
Tc stim 3
판독

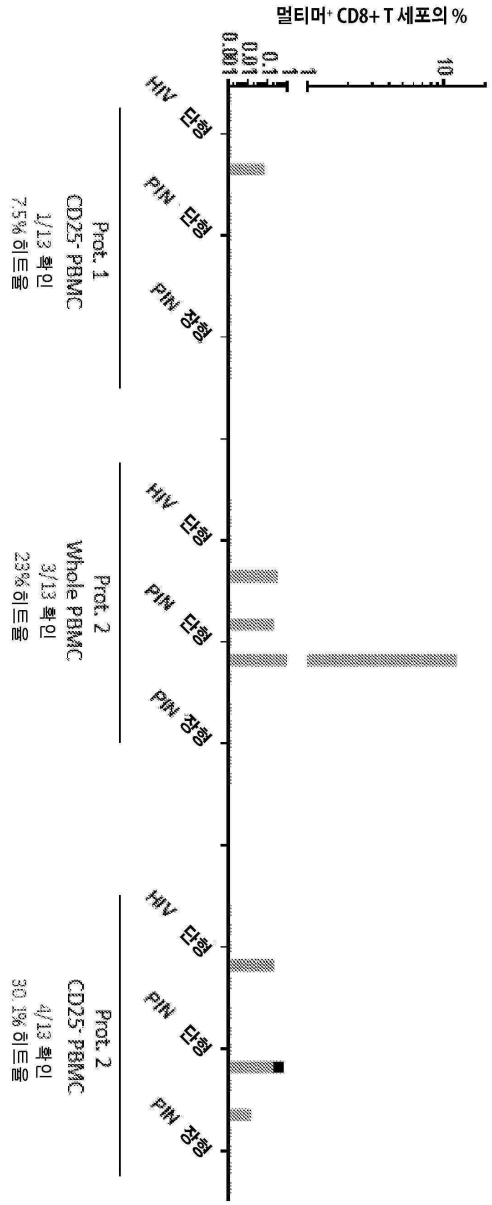
도면2


CD8+ 기억 확장
% 테트라머 + 세포
60
50
40
30
20
10
0
****
****
Prot. 1
Prot. 2
Prot. 2
Prot. 1
Prot. 2
Prot. 2
원액
Treg-
원액
Treg-
장형 펩티드
단형 펩티드

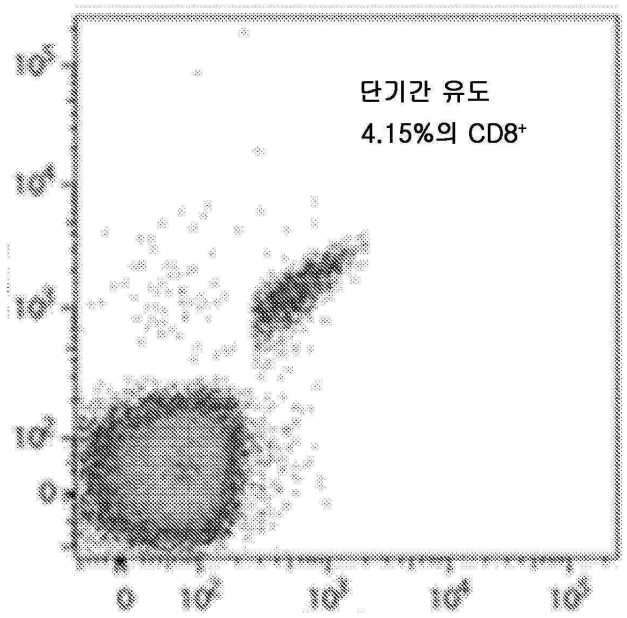
도면3



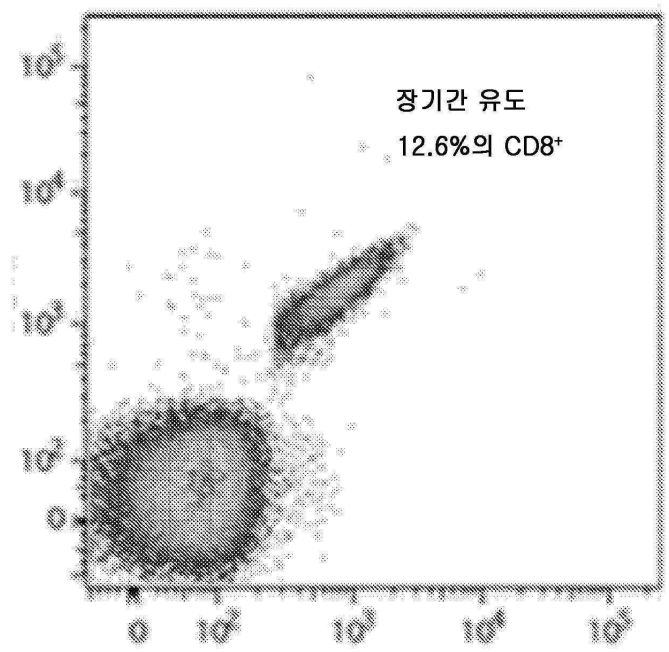
도면4


멀티머+ CD8+ T 세포의 %
0.001
0.01
0.1
1
10
HIV 단형
PIN 단형
PIN 정형
Prot. 1
CD25- PBMC
1/13 확인
7.5% 히트율
HIV 단형
PIN 단형
PIN 정형
Prot. 2
Whole PBMC
3/13 확인
23% 히트율
HIV 단형
PIN 단형
PIN 정형
Prot. 2
CD25- PBMC
4/13 확인
30.1% 히트율

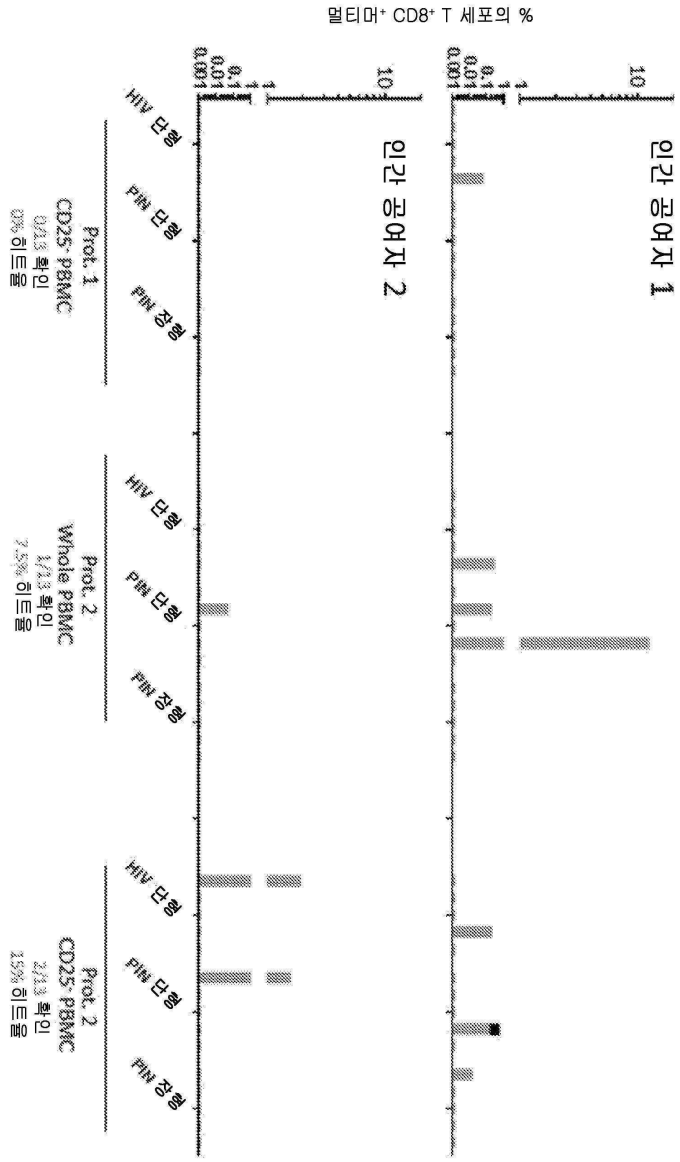
도면5a


단기간 유도
4.15%의 CD8+
0
10²
10³
10⁴
10⁵

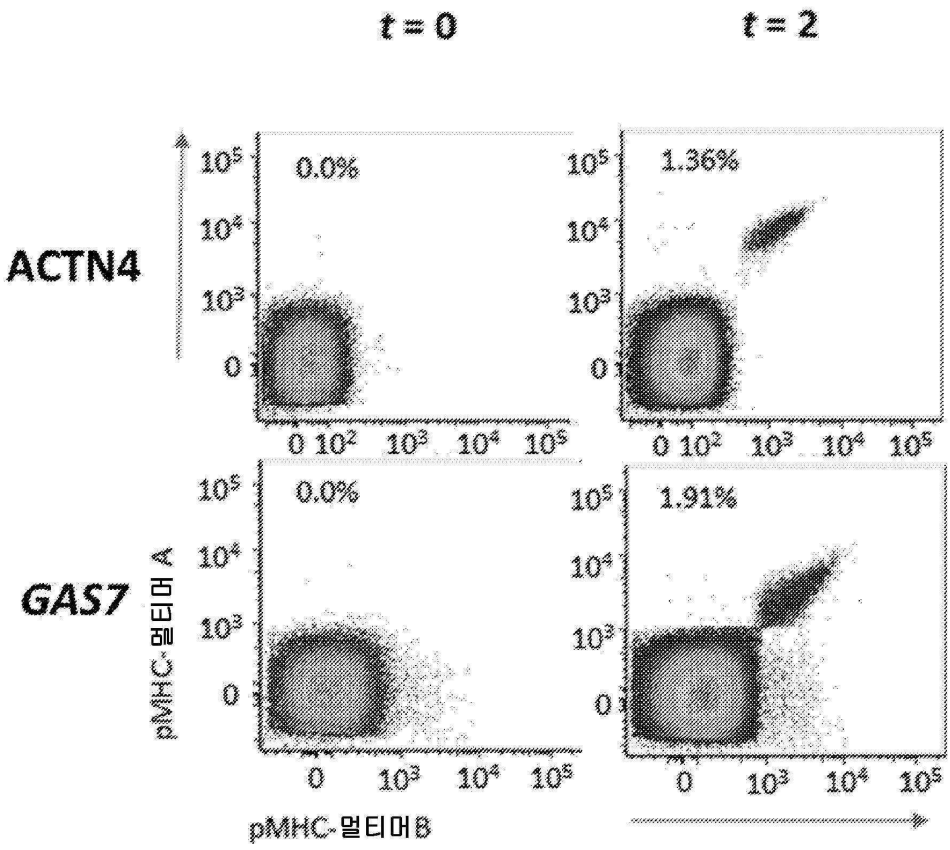
도면5b


장기간 유도
12.6%의 CD8+
0
10²
10³
10⁴
10⁵

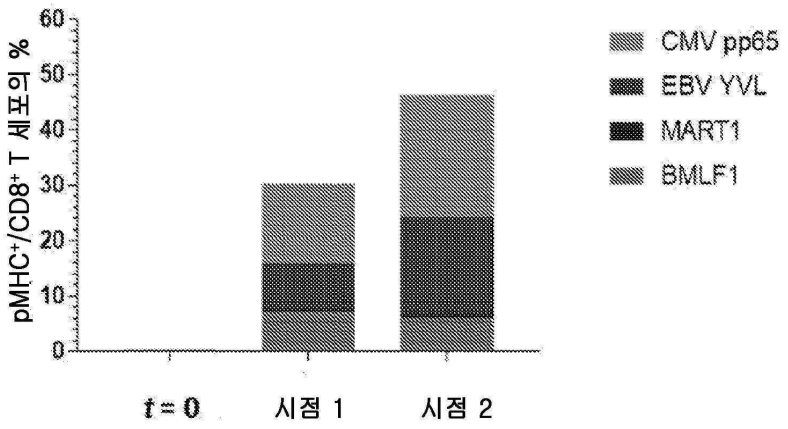
도면6


멀티머+ CD8+ T 세포의 %
인간 공여자 1
인간 공여자 2
10
1
0.1
0.01
0.001
HIV 단일
PIN 단일
PIN 정렬
Prot. 1
CD25+ PBMC
0.13 확인
0% 히트율
Prot. 2
Whole PBMC
1.73 확인
7.5% 히트율
Prot. 2
CD25+ PBMC
2.13 확인
15% 히트율

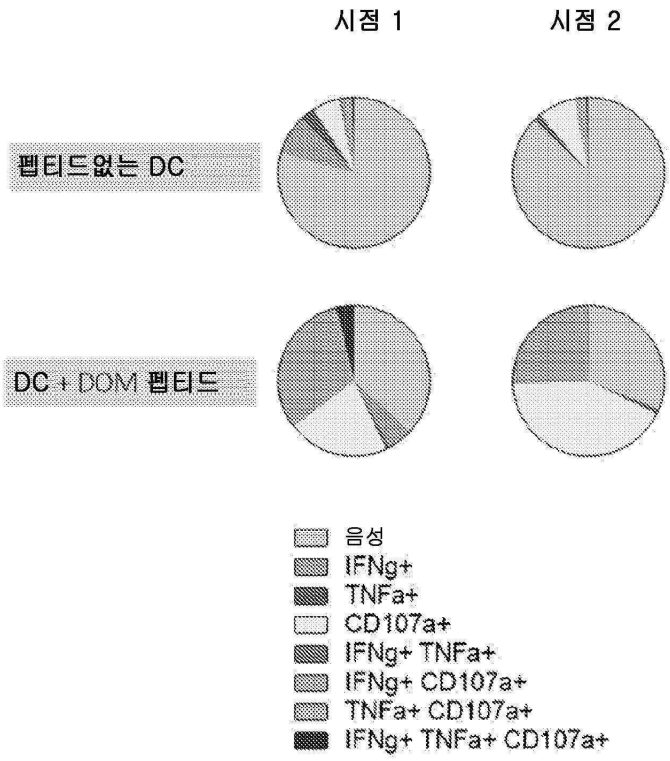
도면7


t = 0
t = 2
ACTN4
GAS7
0.0%
1.36%
0.0%
1.91%
pMHC-멀티머 A
pMHC-멀티머 B

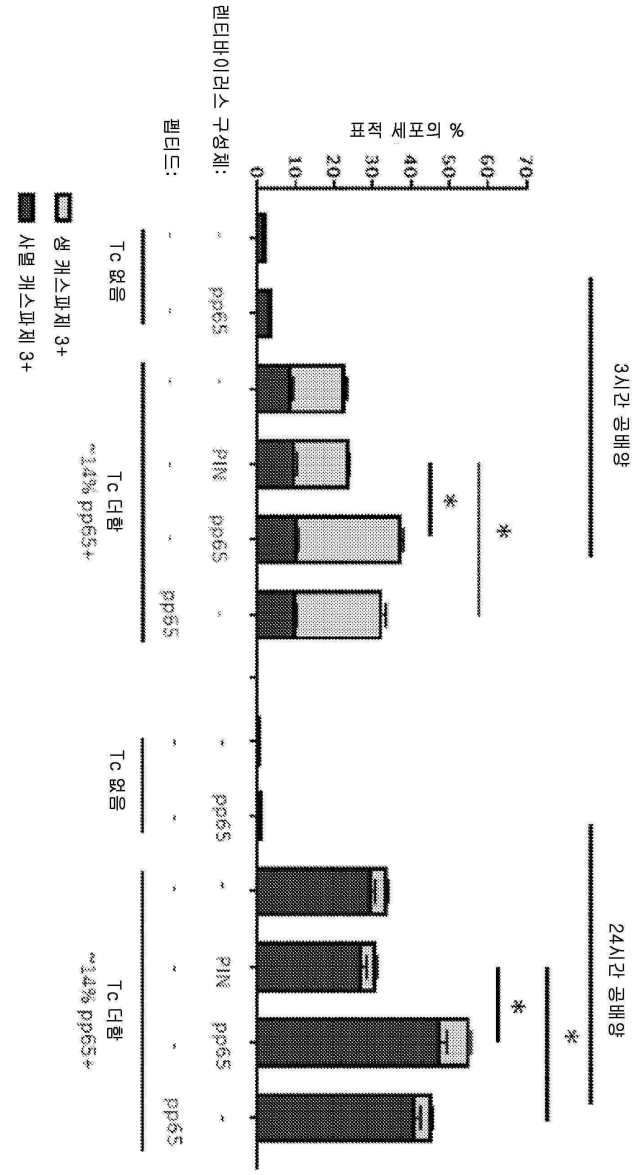
도면8a


pMHC+/CD8+ T 세포의 %
CMV pp65
EBV YVL
MART1
BMLF1
t = 0
시점 1
시점 2

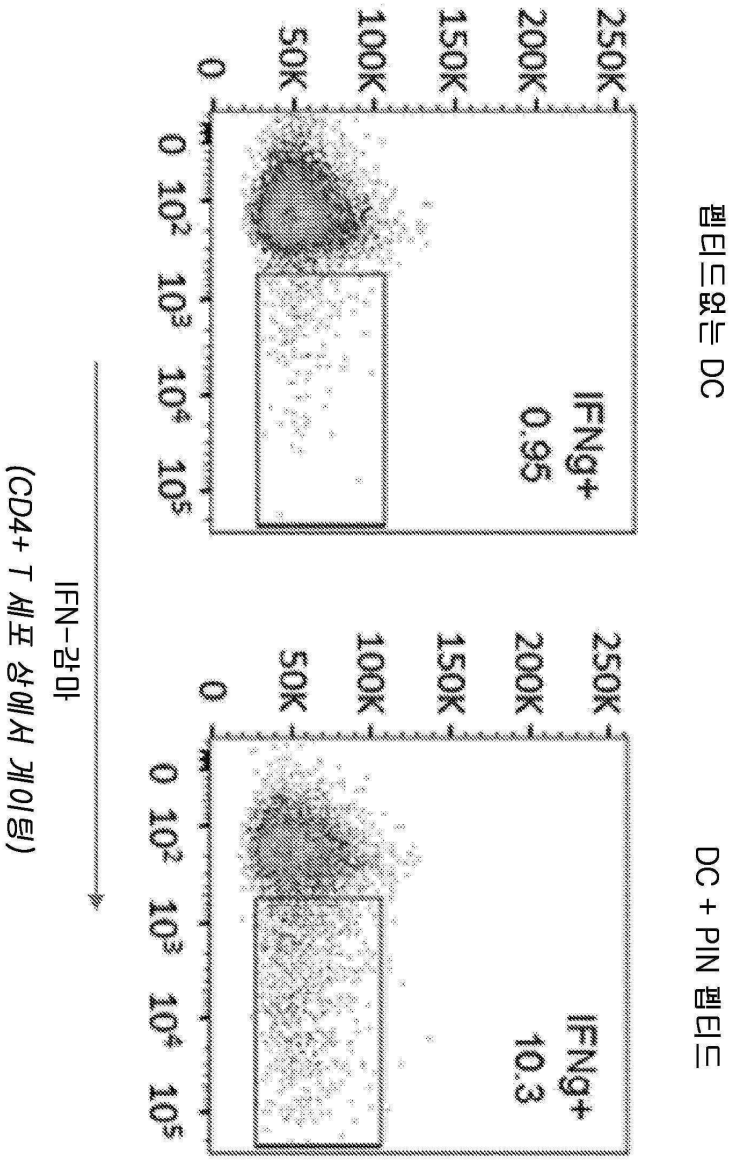
도면8b


시점 1
시점 2
펩티드없는 DC
DC + DOM 펩티드
음성
IFNg+
TNFa+
CD107a+
IFNg+ TNFa+
IFNg+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNg+ TNFa+ CD107a+

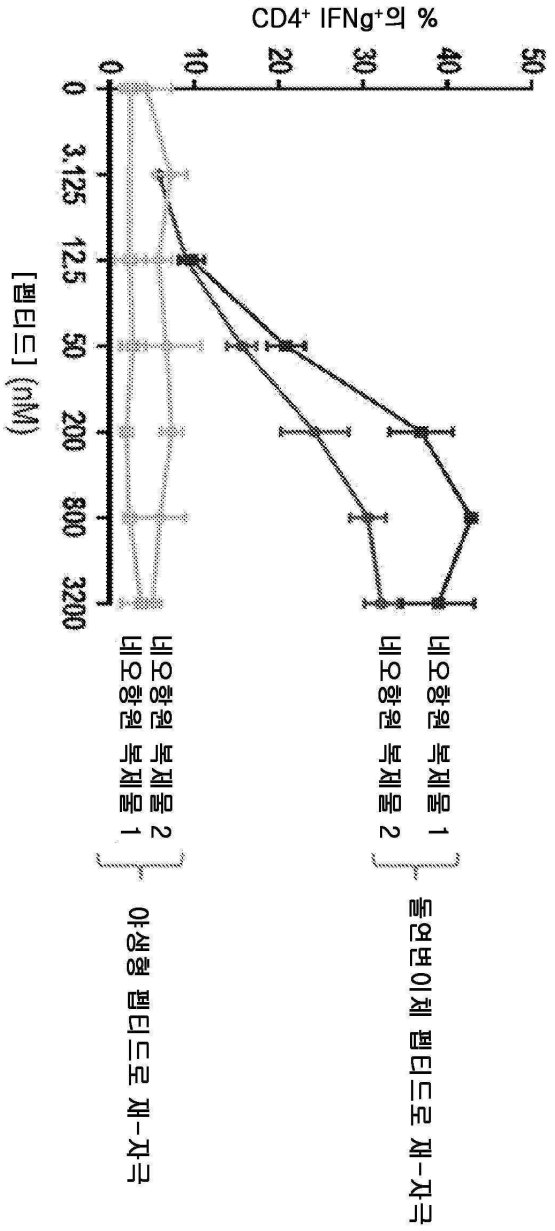
도면9


표적 세포의 %
0
10
20
30
40
50
60
70
3시간 공배양
24시간 공배양
*
*
*
*
레티바이러스 구성체:
펩티드:
pp65
pIW
pp65
pp65
pp65
pIW
pp65
pp65
Tc 없음
Tc 더함
~3.4% pp65+
Tc 없음
Tc 더함
~3.4% pp65+
생 캐스파제 3+
사멸 캐스파제 3+

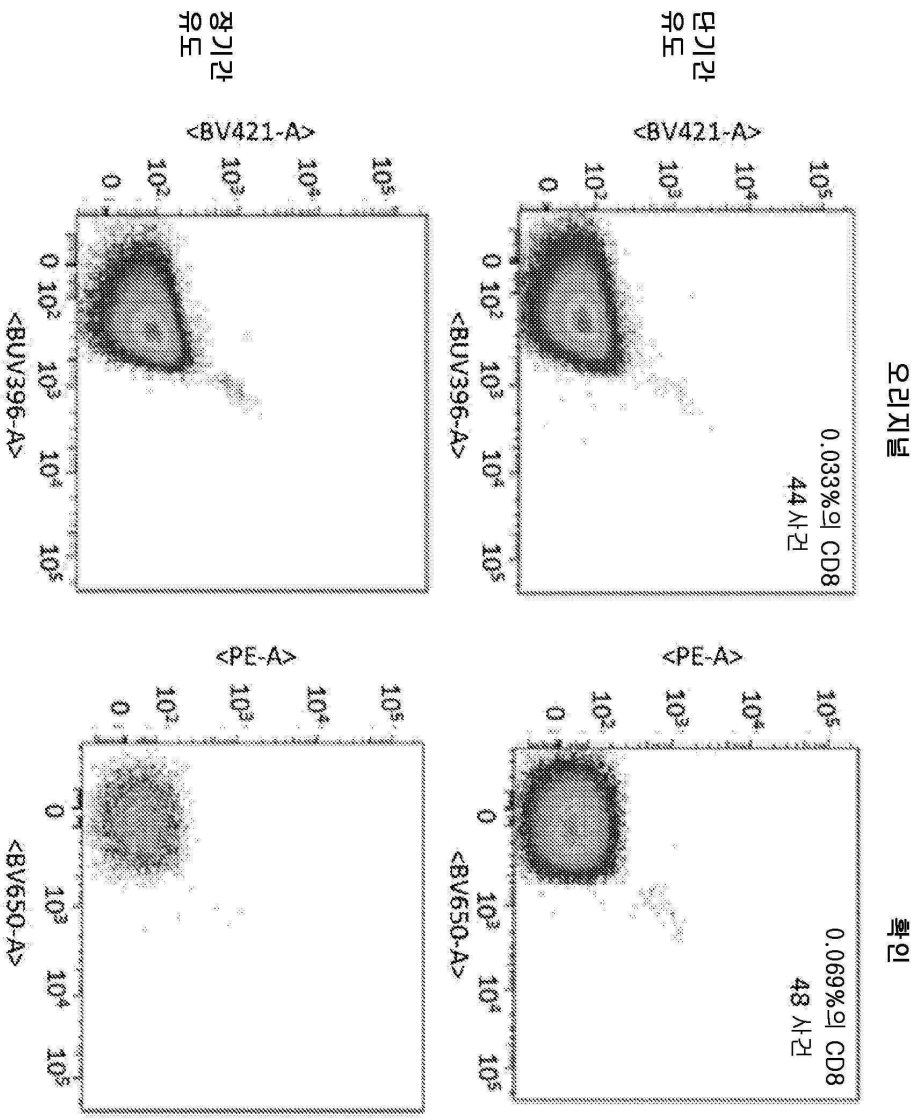
도면10


펩티드없는 DC
DC + PIN 펩티드
IFN-감마
(CD4+ T 세포 상에서 게이팅)
IFNg+
0.95
IFNg+
10.3
0
50K
100K
150K
200K
250K
0
10²
10³
10⁴
10⁵

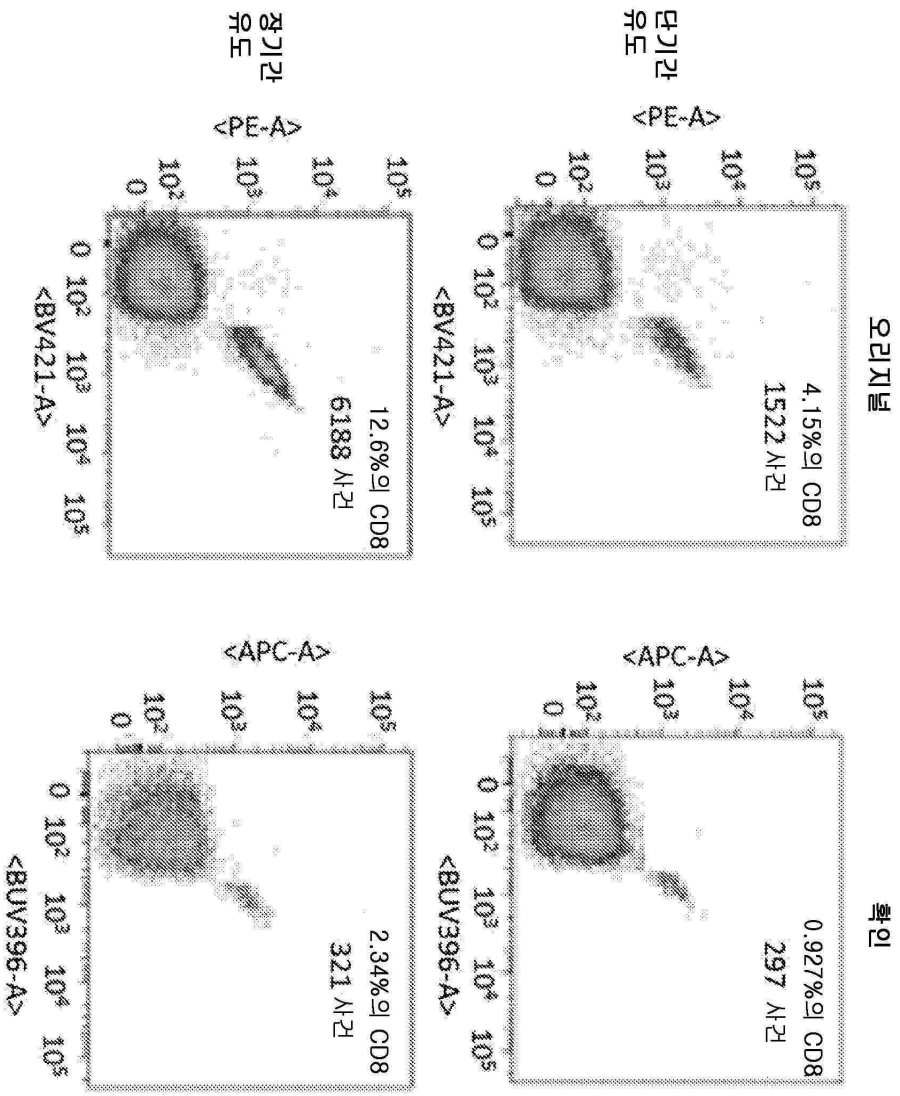
도면11


CD4+ IFNg+의 %
0
10
20
30
40
50
[펩티드] (nM)
0
3.125
12.5
50
200
800
3200
네오항원 복제물 1
네오항원 복제물 2
돌연변이체 펩티드로 재-자극
네오항원 복제물 2
네오항원 복제물 1
야생형 펩티드로 재-자극

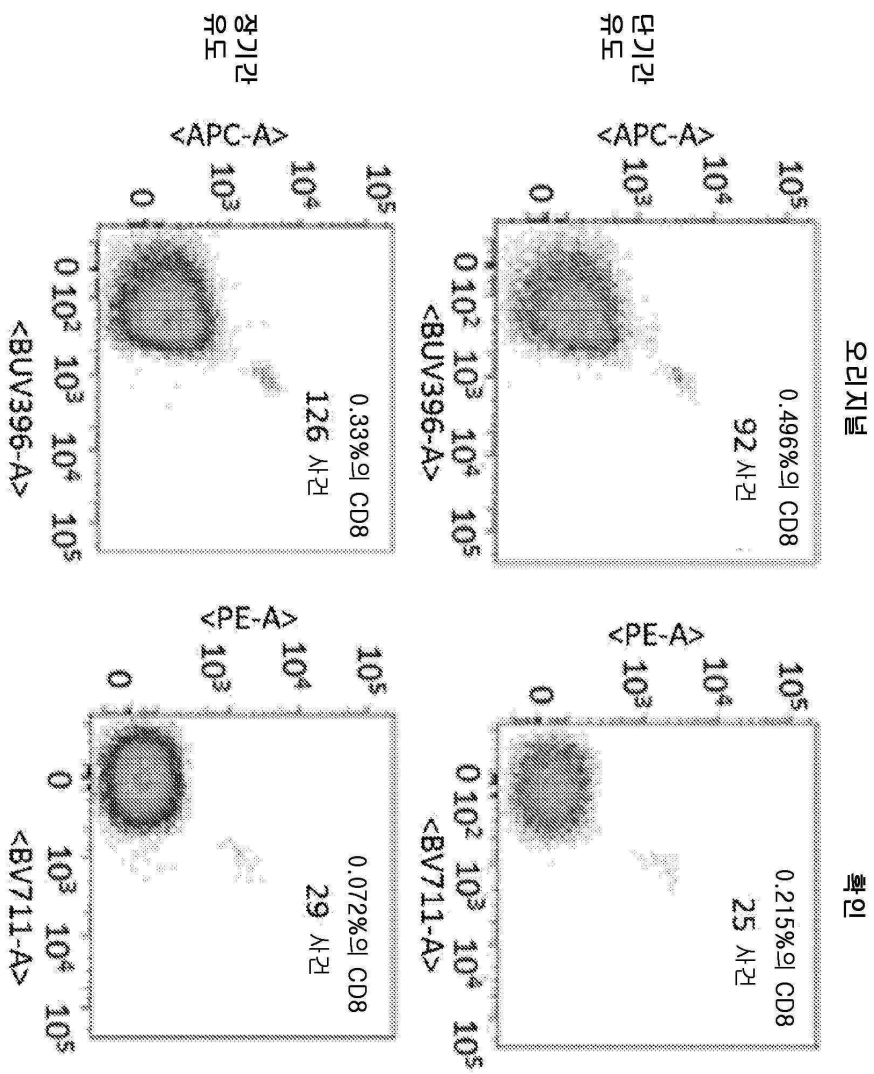
도면12


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<BV421-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV650-A>
0.033%의 CD8
44 사건
0.069%의 CD8
48 사건

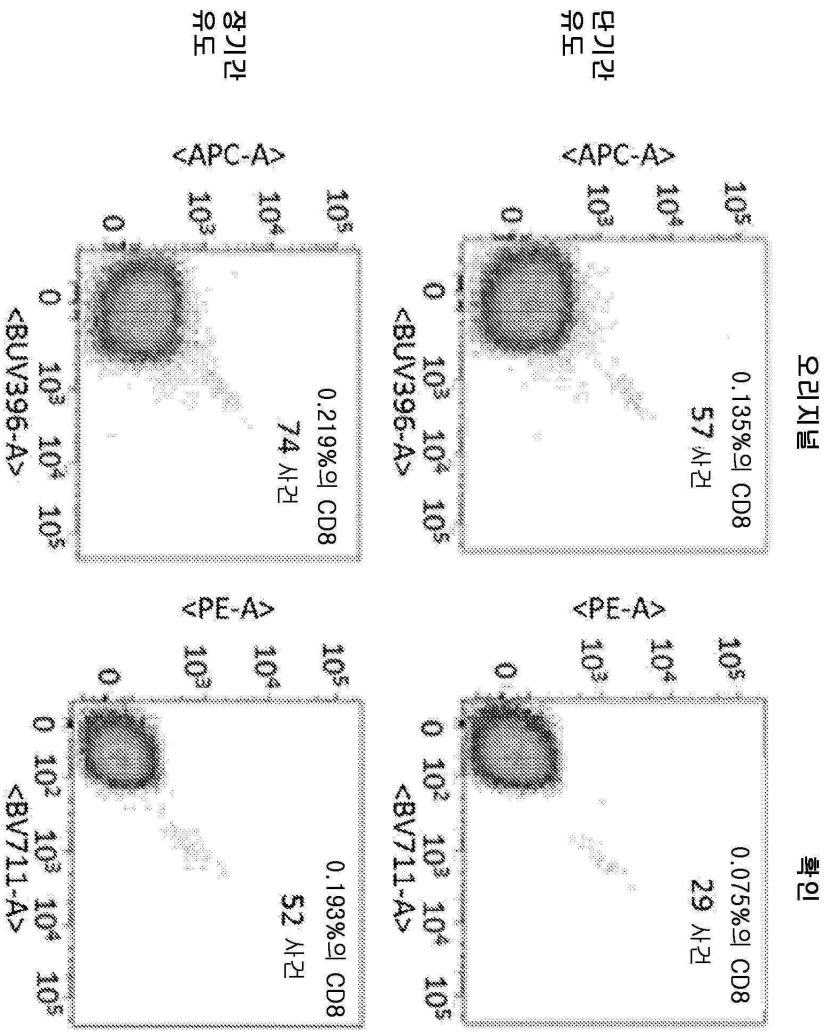
도면13


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<PE-A>
<BV421-A>
<APC-A>
<BUV396-A>
4.15%의 CD8
1522 사건
0.927%의 CD8
297 사건
12.6%의 CD8
6188 사건
2.34%의 CD8
321 사건

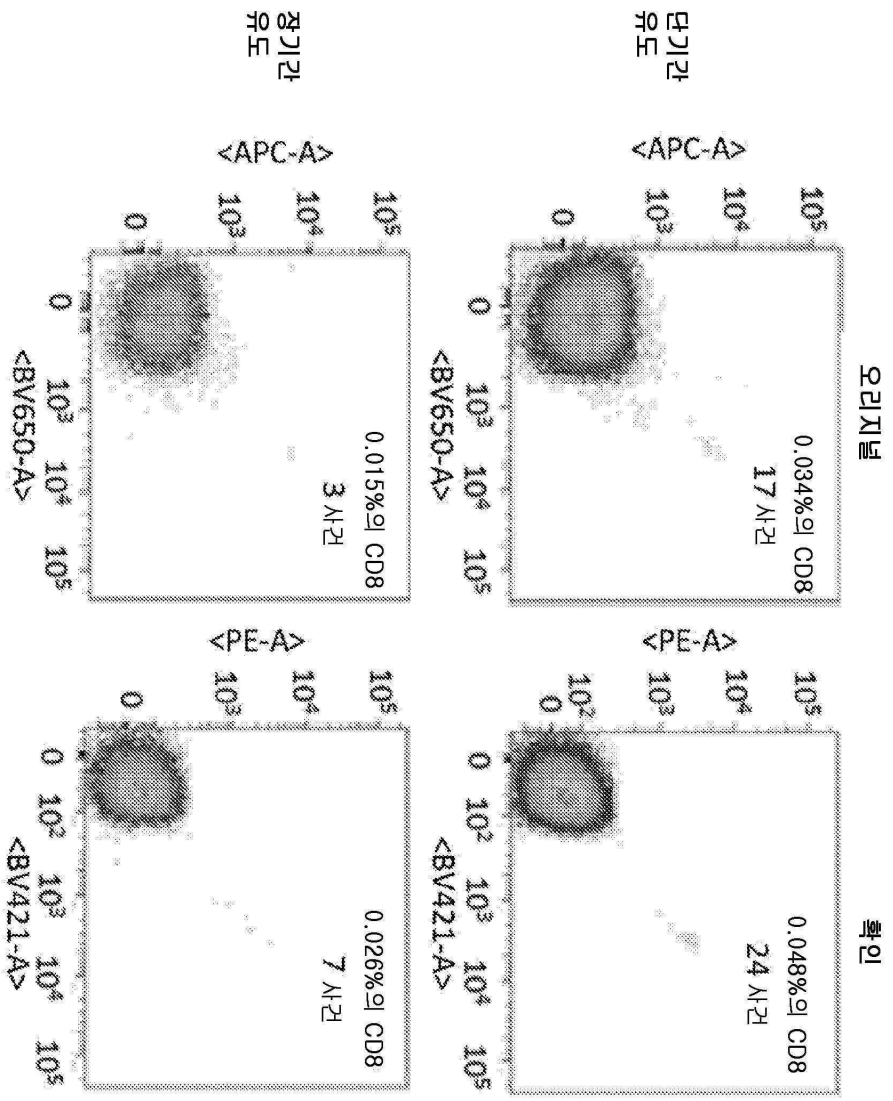
도면14


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<APC-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV711-A>
0.496%의 CD8
92 사건
0.215%의 CD8
25 사건
0.33%의 CD8
126 사건
0.072%의 CD8
29 사건

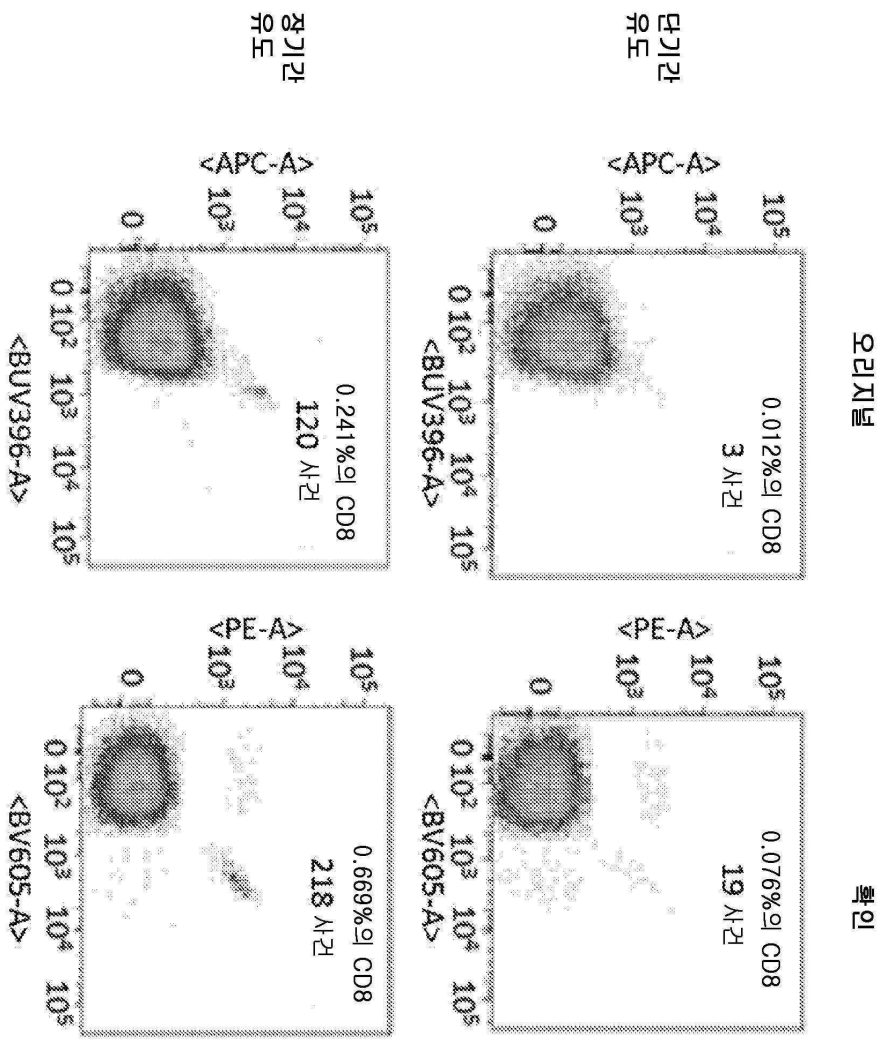
도면15


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<APC-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV711-A>
0.135%의 CD8
57 사건
0.075%의 CD8
29 사건
0.219%의 CD8
74 사건
0.193%의 CD8
52 사건

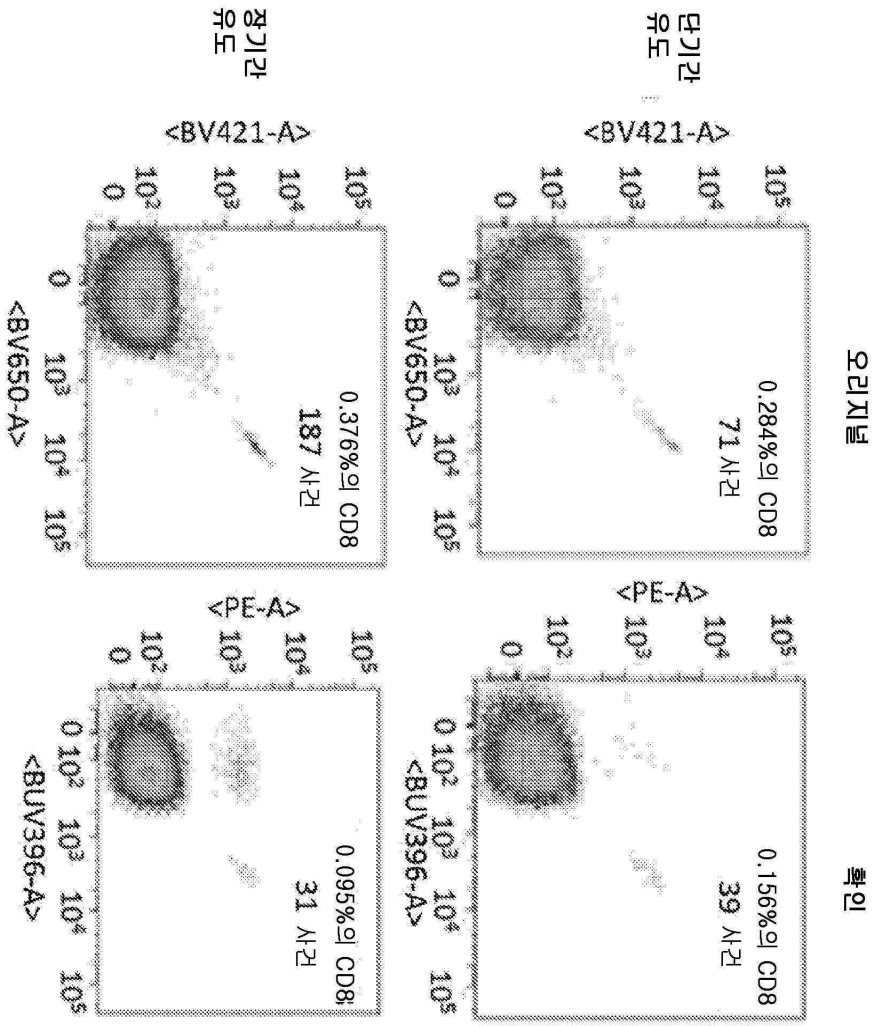
도면16


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<APC-A>
<PE-A>
<BV650-A>
<BV421-A>
0.034%의 CD8
17 사건
0.048%의 CD8
24 사건
0.015%의 CD8
3 사건
0.026%의 CD8
7 사건

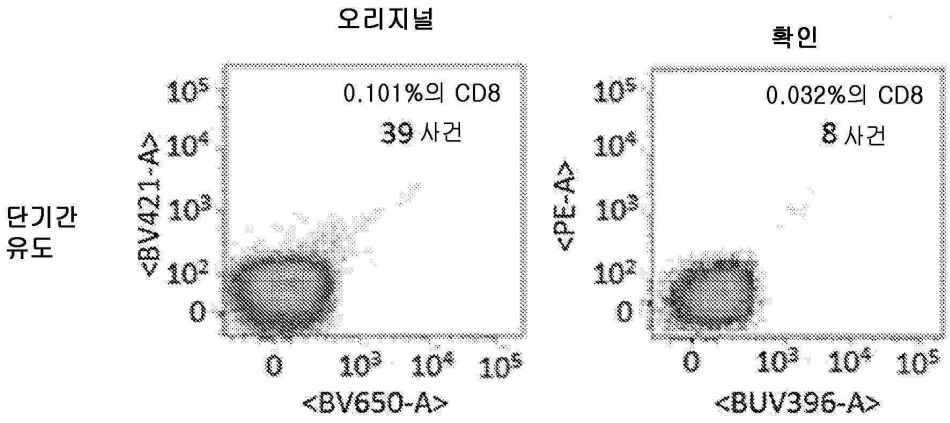
도면17


오리지널
확인
단기간 유도
장기간 유도
<APC-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV605-A>
0.012%의 CD8
3 사건
0.076%의 CD8
19 사건
0.241%의 CD8
120 사건
0.669%의 CD8
218 사건

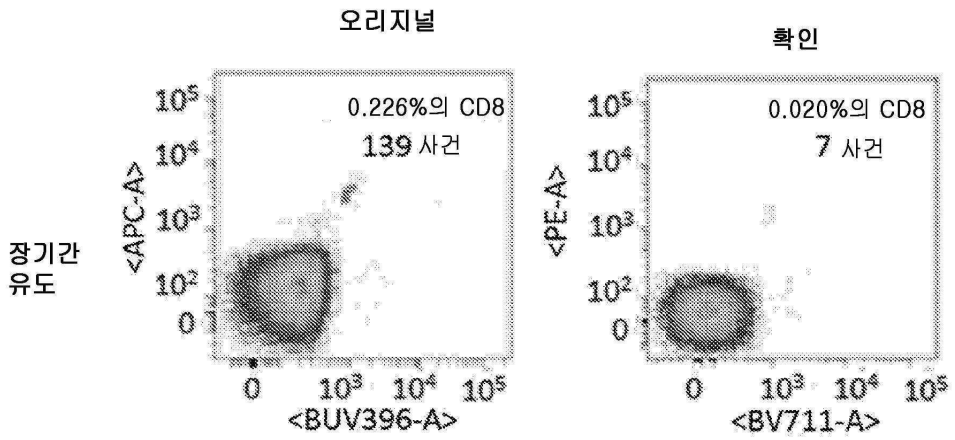
도면18


장기간 유도
단기간 유도
<BV421-A>
<BV650-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
0.376%의 CD8
187 사건
0.284%의 CD8
71 사건
0.095%의 CD8
31 사건
0.156%의 CD8
39 사건
오리지널
확인

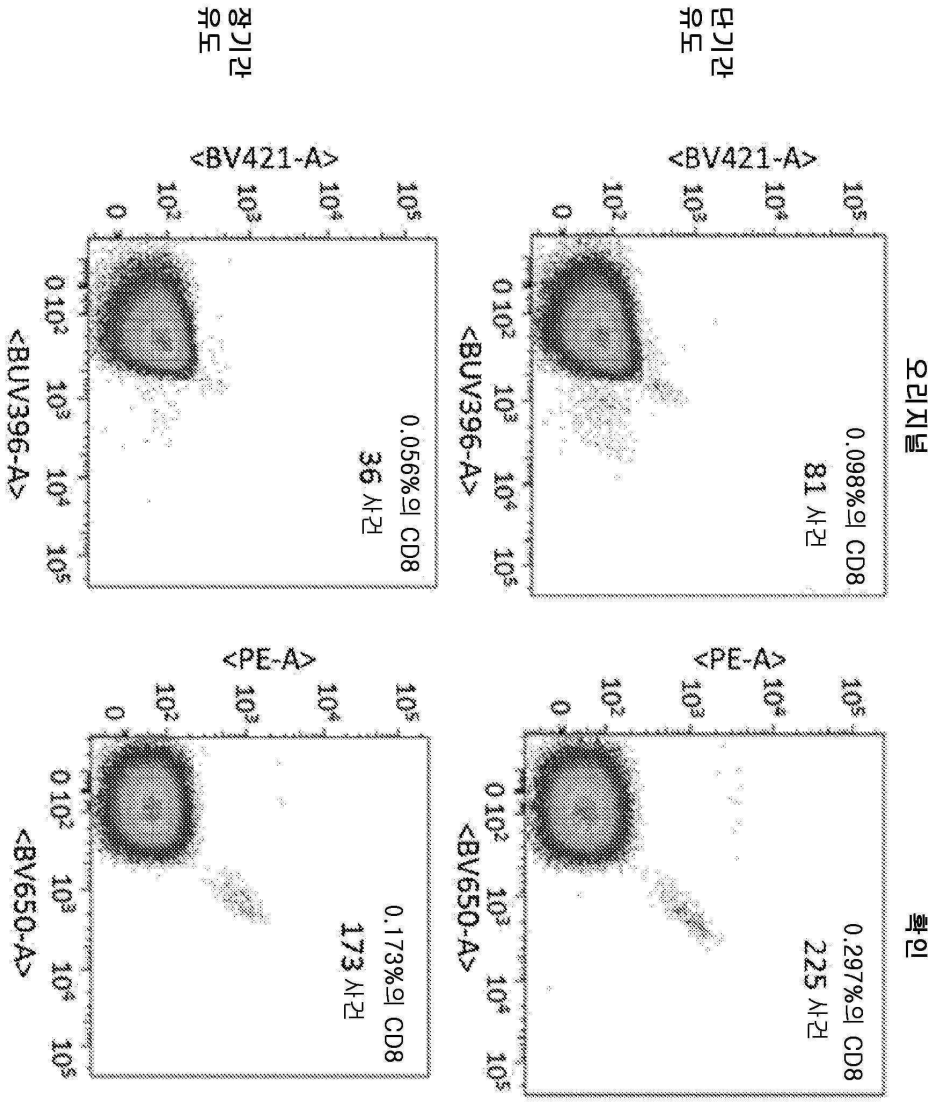
도면19a


오리지널
확인
단기간 유도
<BV421-A>
<BV650-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
0.101%의 CD8
39 사건
0.032%의 CD8
8 사건

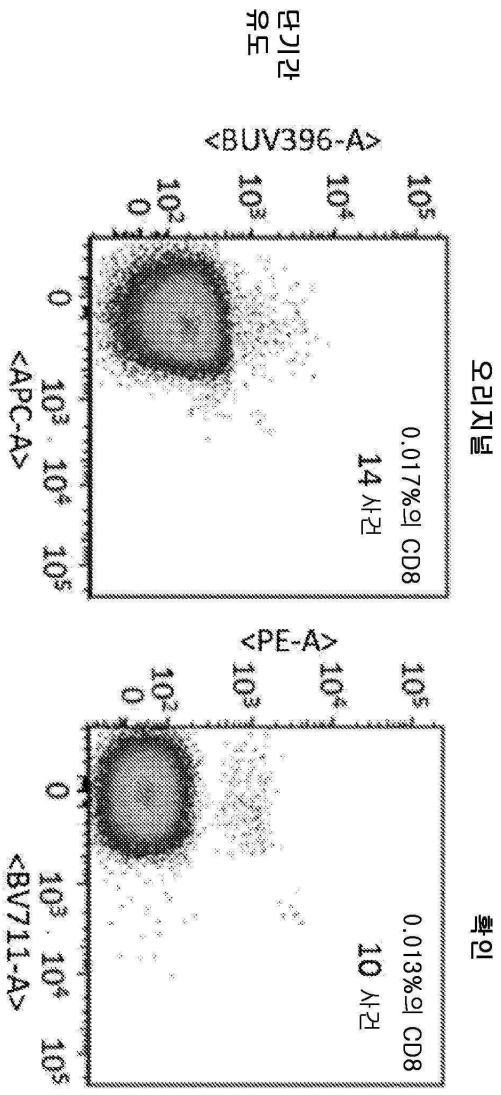
도면19b


오리지널
확인
장기간 유도
0.226%의 CD8
139 사건
0.020%의 CD8
7 사건
<APC-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV711-A>

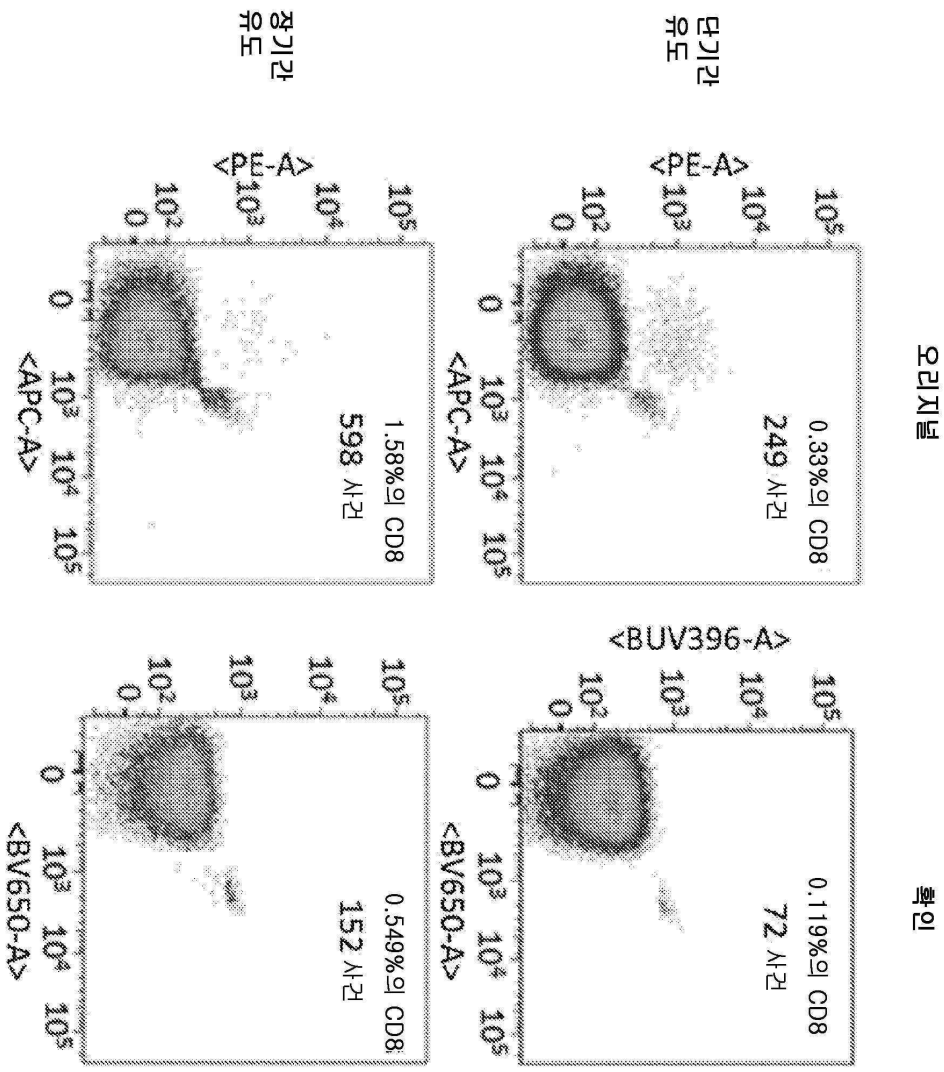
도면20


장기간 유도
단기간 유도
<BV421-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV650-A>
0.056%의 CD8
36 사건
0.098%의 CD8
81 사건
0.173%의 CD8
173 사건
0.297%의 CD8
225 사건
오리지널
확인

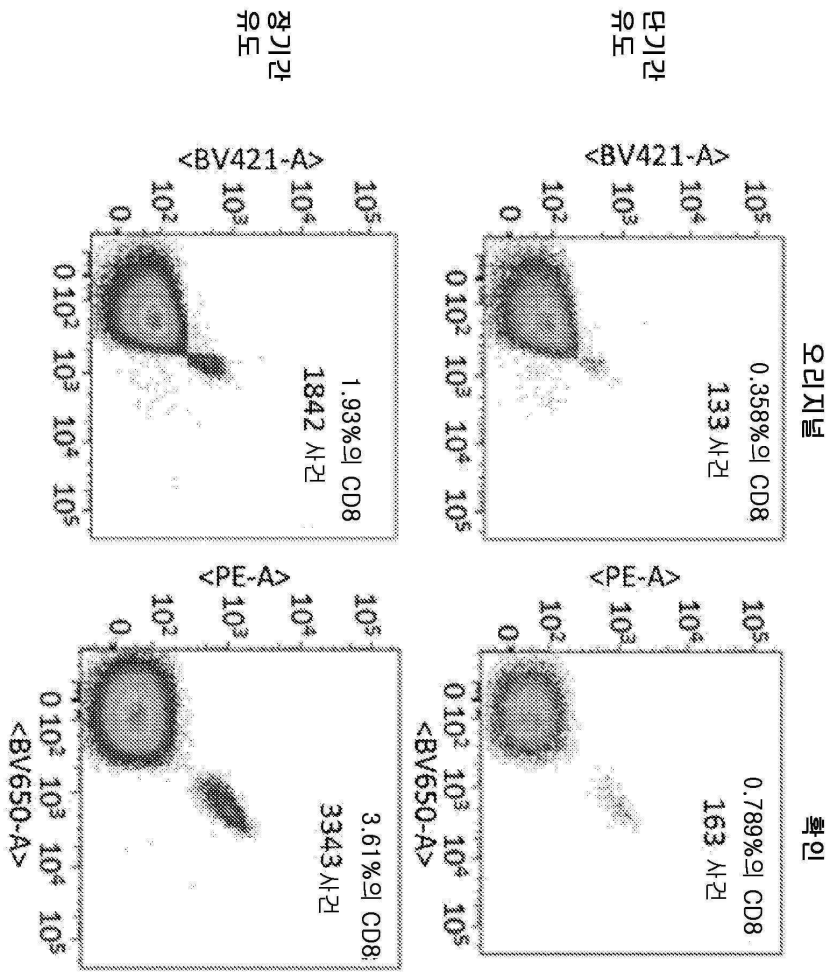
도면21


단기간
유도
<BUV396-A>
<APC-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5
14 사건
0.017%의 CD8
오리지널
<PE-A>
<BV711-A>
10 사건
0.013%의 CD8
혹인

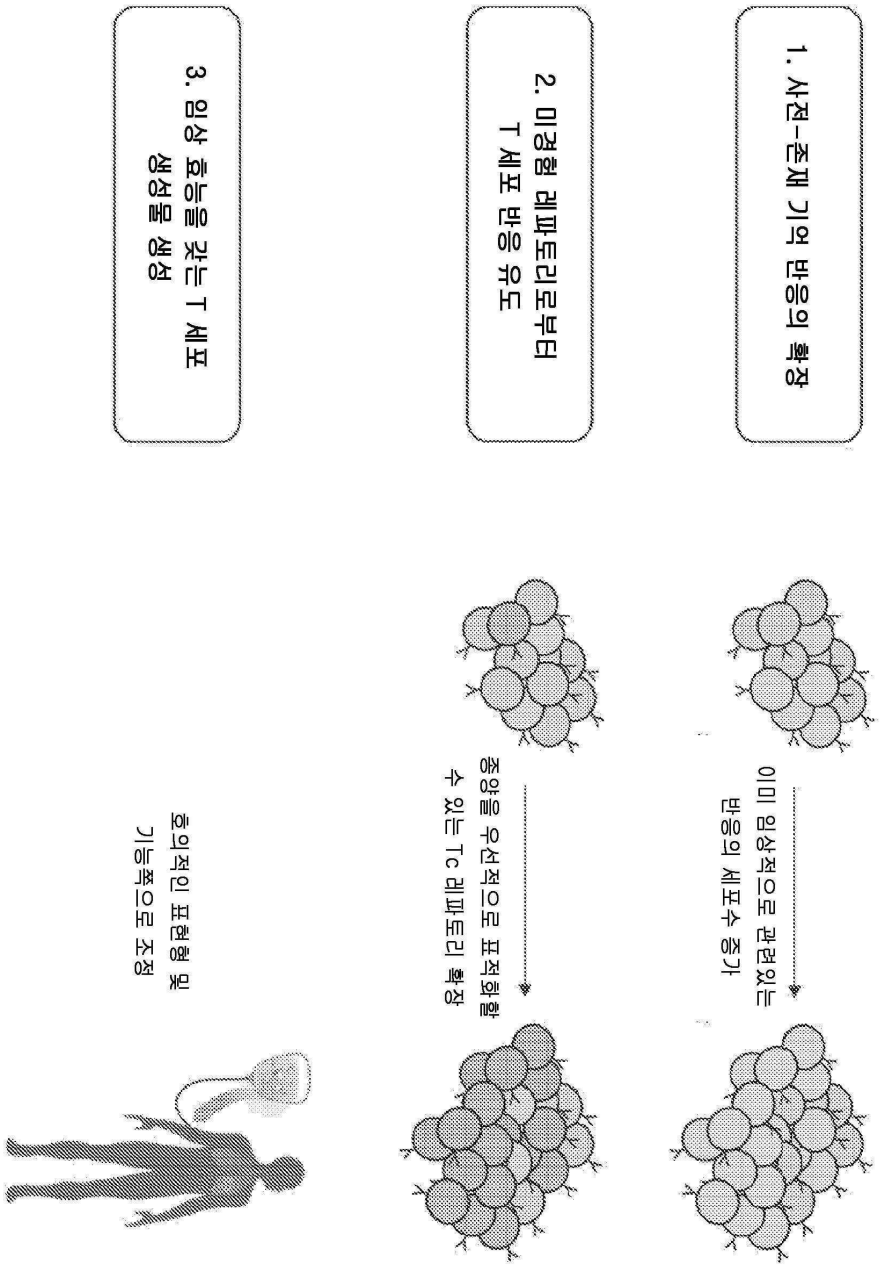
도면22


오리지널
휴인
단기간 유도
장기간 유도
<PE-A>
<APC-A>
<BUV396-A>
<BV650-A>
0.33%의 CD8
249 사건
1.58%의 CD8
598 사건
0.119%의 CD8
72 사건
0.549%의 CD8
152 사건

도면23


단기간 유도
장기간 유도
오리지널
확인
<BV421-A>
<PE-A>
<BV650-A>
0.358%의 CD8
133 사건
1.93%의 CD8
1842 사건
0.789%의 CD8
163 사건
3.61%의 CD8
3343 사건

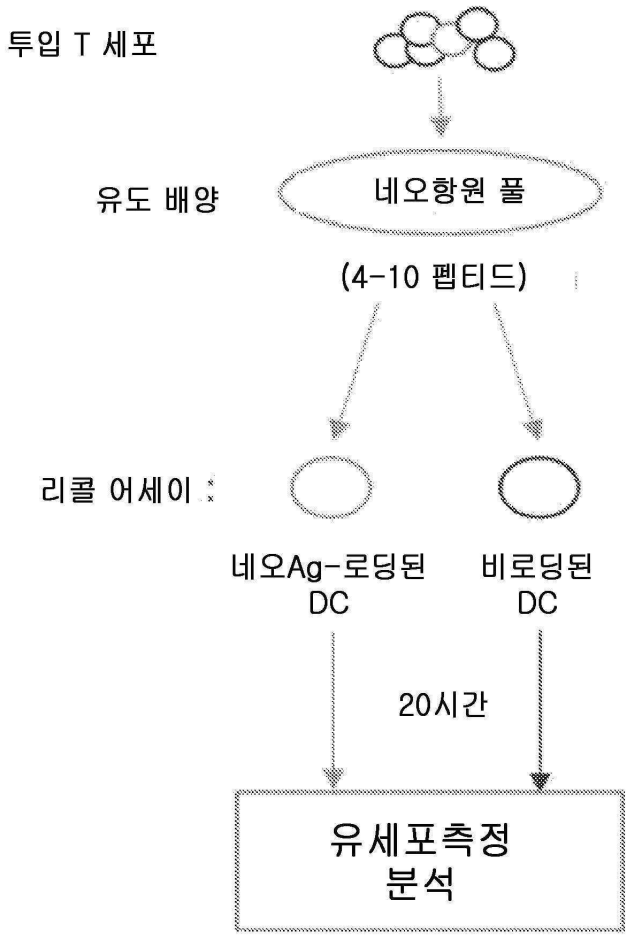
도면24


1. 사전-존재 기억 반응의 확장
2. 미경험 레파토리로부터 T 세포 반응 유도
3. 임상 효능을 갖는 T 세포 생성물 생성
이미 임상적으로 관련있는 반응의 세포수 증가
중앙을 우선적으로 표적화할 수 있는 Tc 레파토리 확장
효의적인 표현형 및 기능쪽으로 조정

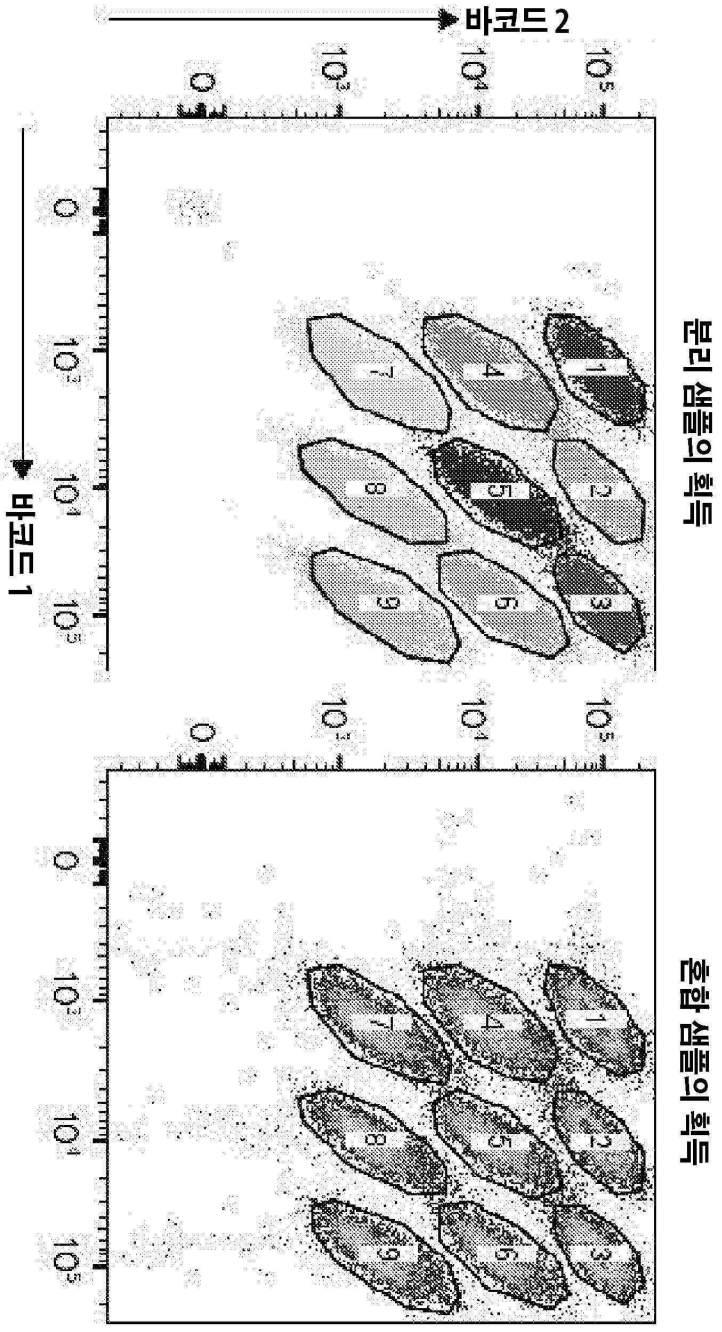
도면25

1. 유도 수행
2. 펩티드 로딩된 새로운 DC에서 리콜
3. T 세포의 특이성, 표현형 및/또는 기능 평가
PBMC+DC
(+ 펩티드)
PBMC+DC
(펩티드없음)
제1 시간 기간
제2 시간 기간
특이성/강도 어세이 (예를 들어, 유세포측정에 의함), 세포 사멸 어세이, 및/또는 사이토카인 방출 어세이

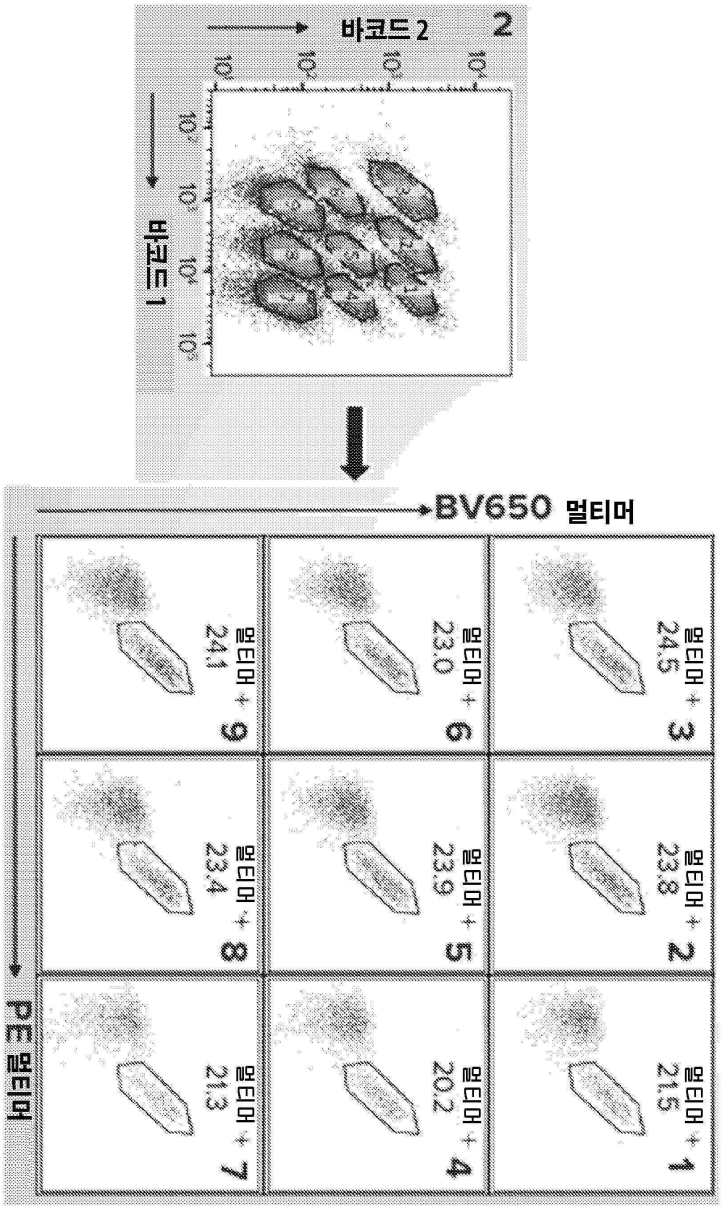
도면26


투입 T 세포
유도 배양
네오항원 풀
(4-10 펩티드)
리콜 어세이
네오Ag-로딩된 DC
비로딩된 DC
20시간
유세포측정 분석

도면27a

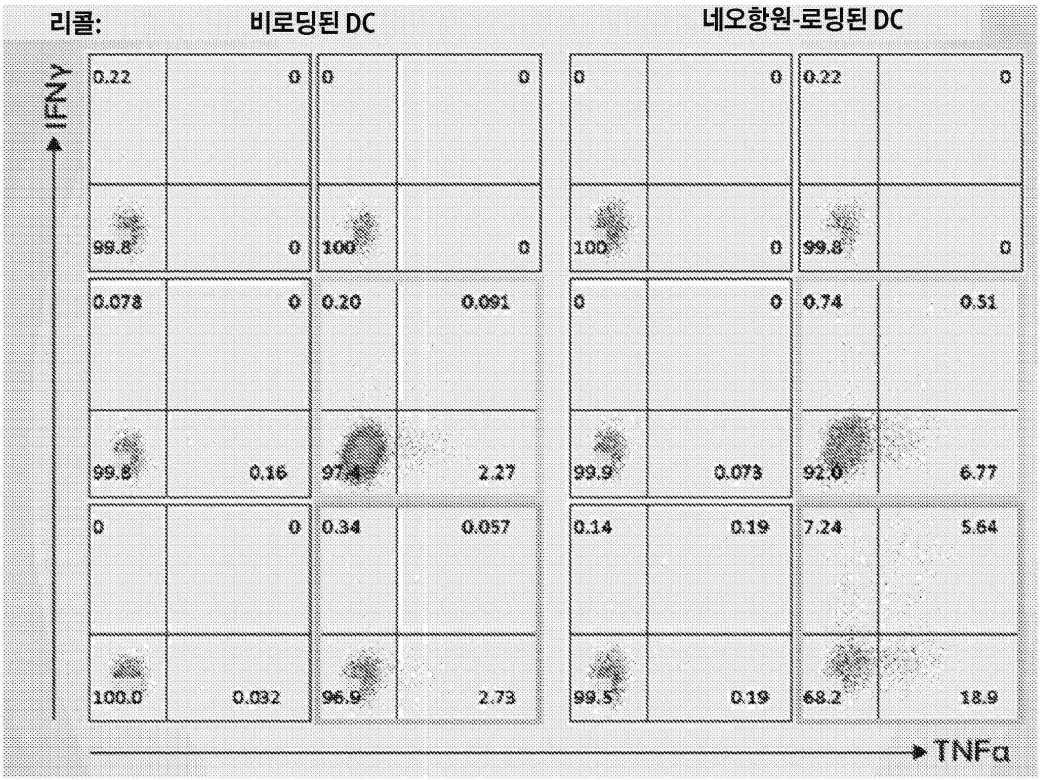

바코드 2
바코드 1
0
10^3
10^4
10^5
10^2
10^1
10^5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
분리 샘플의 획득
혼합 샘플의 획득

도면27b

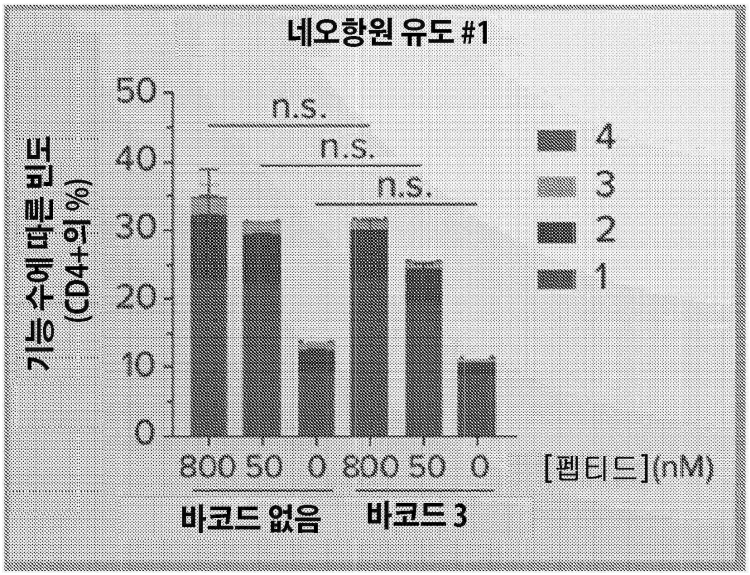

바코드 2
2
바코드 1
BV650 멀티머
PE 멀티머
멀티머 + 1
21.5
멀티머 + 2
23.8
멀티머 + 3
24.5
멀티머 + 4
20.2
멀티머 + 5
23.9
멀티머 + 6
23.0
멀티머 + 7
21.3
멀티머 + 8
23.4
멀티머 + 9
24.1

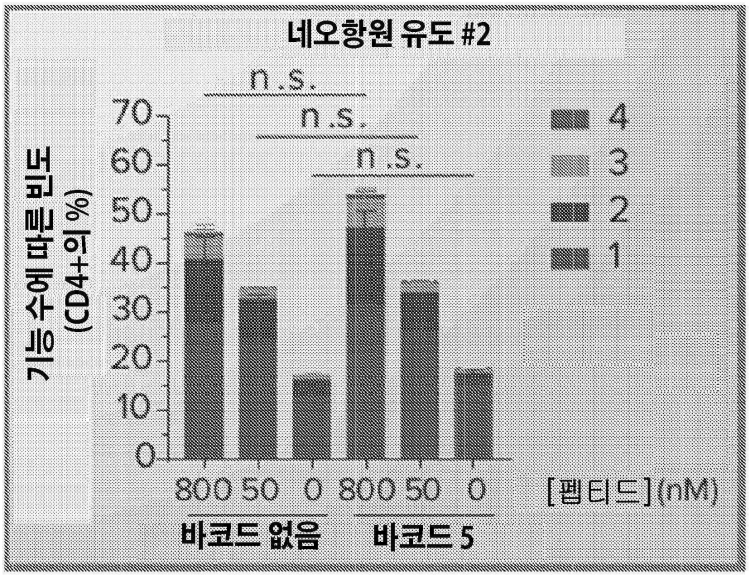
도면28a

바코드 2	바코드 1
바코드 4	바코드 3 (네오항원 유도#1)
바코드 6	바코드 5 (네오항원 유도#2)

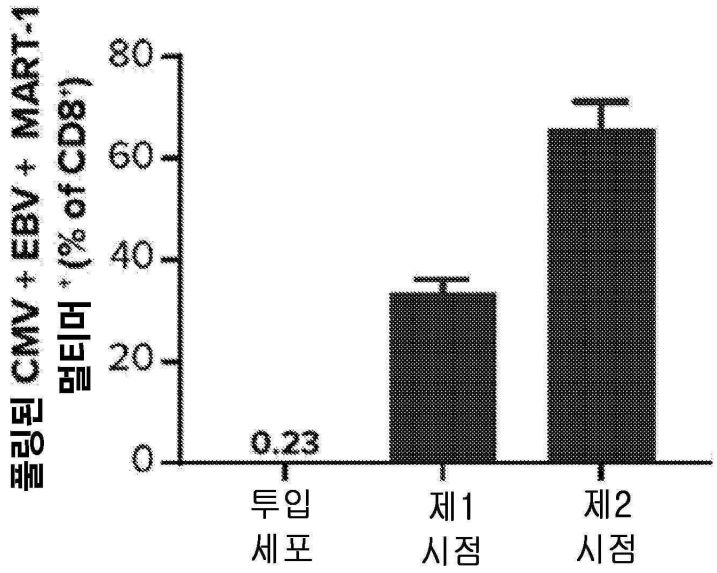


도면28b

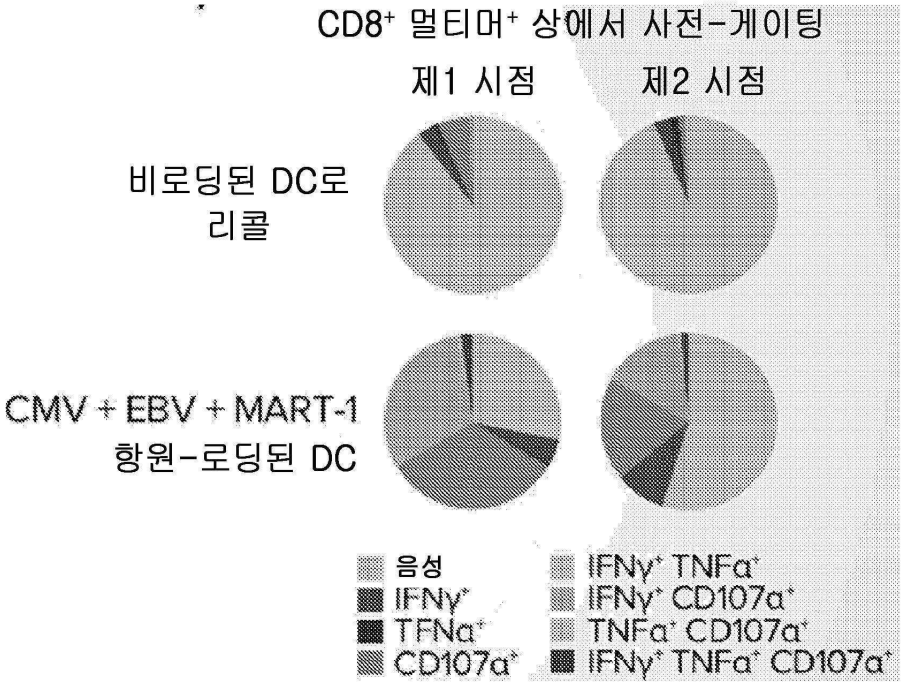

네오항원 유도 #1
기능 수에 따른 빈도
(CD4+의 %)
50
40
30
20
10
0
n.s.
n.s.
n.s.
4
3
2
1
800 50 0 800 50 0
[펩티드](nM)
바코드 없음
바코드 3


네오항원 유도 #2
기능 수에 따른 빈도
(CD4+의 %)
70
60
50
40
30
20
10
0
n.s.
n.s.
n.s.
4
3
2
1
800 50 0 800 50 0
[펩티드](nM)
바코드 없음
바코드 5

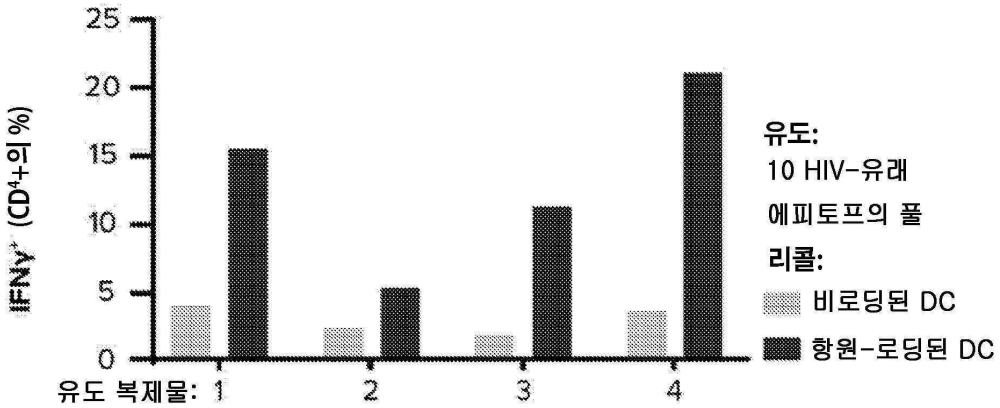
도면29a


폴링된 CMV + EBV + MART-1 멀티머+ (% of CD8+)
80
60
40
20
0
0.23
투입 세포
제1 시점
제2 시점

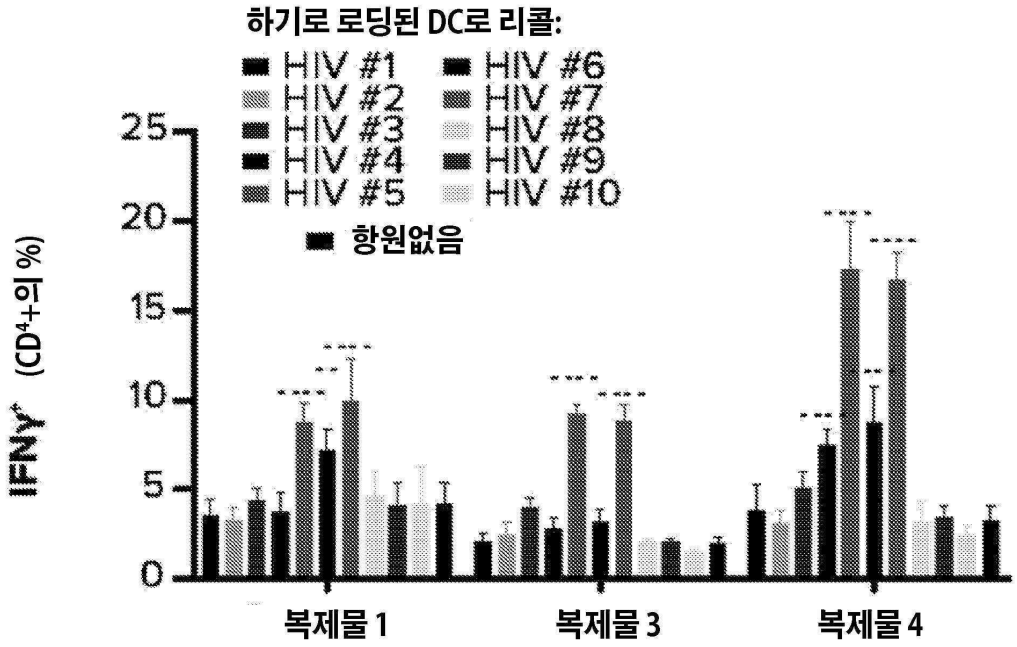
도면29b


CD8+ 멀티머+ 상에서 사전-게이팅
제1 시점
제2 시점
비로딩된 DC로 리콜
CMV + EBV + MART-1 항원-로딩된 DC
음성
IFNγ+
TFNα+
CD107α+
IFNγ+ TNFα+
IFNγ+ CD107α+
TNFα+ CD107α+
IFNγ+ TNFα+ CD107α+

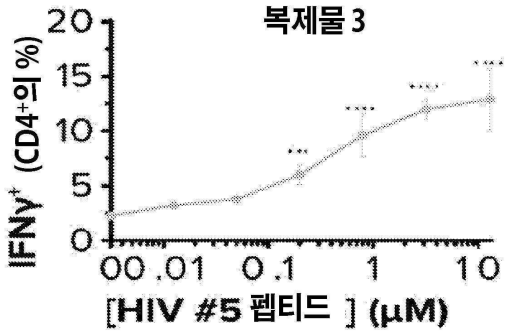
도면30a

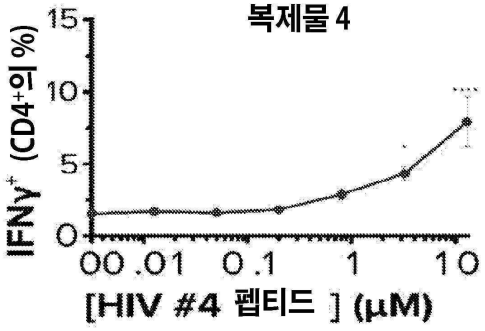

25
20
15
10
5
0
IFNγ+ (CD4+의 %)
유도 복제물: 1
2
3
4
유도:
10 HIV-유래
에피토프의 풀
리콜:
비로딩된 DC
항원-로딩된 DC

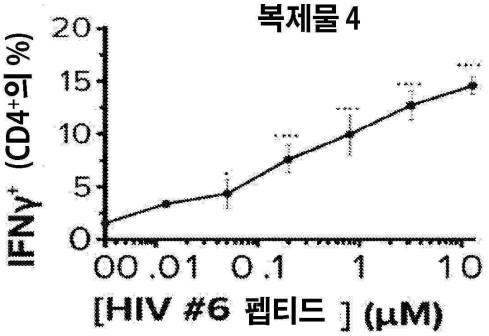
도면30b


하기로 로딩된 DC로 리콜:
HIV #1
HIV #2
HIV #3
HIV #4
HIV #5
HIV #6
HIV #7
HIV #8
HIV #9
HIV #10
항원없음
25
20
15
10
5
0
IFNγ+ (CD4+의 %)
복제물 1
복제물 3
복제물 4

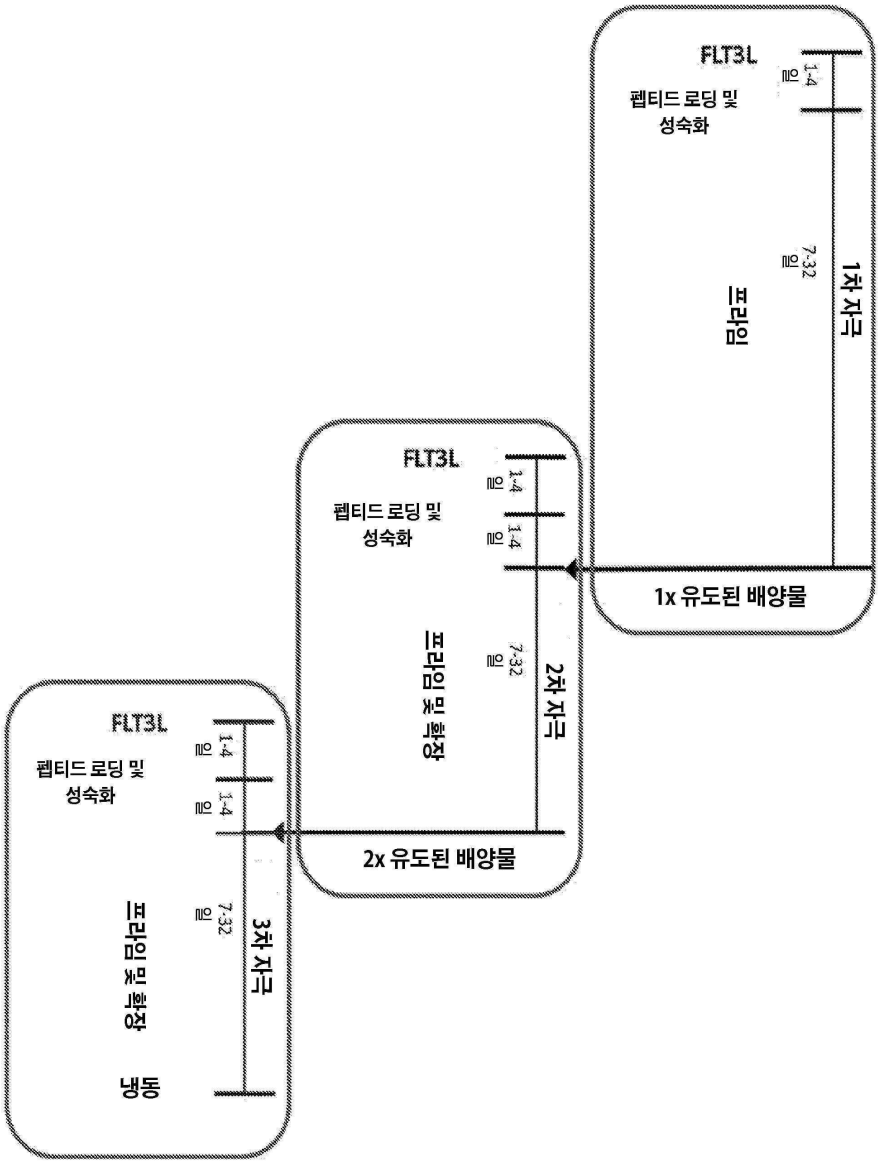
도면30c


복제물 3
IFNγ+ (CD4+의 %)
20
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #5 펩티드] (μM)

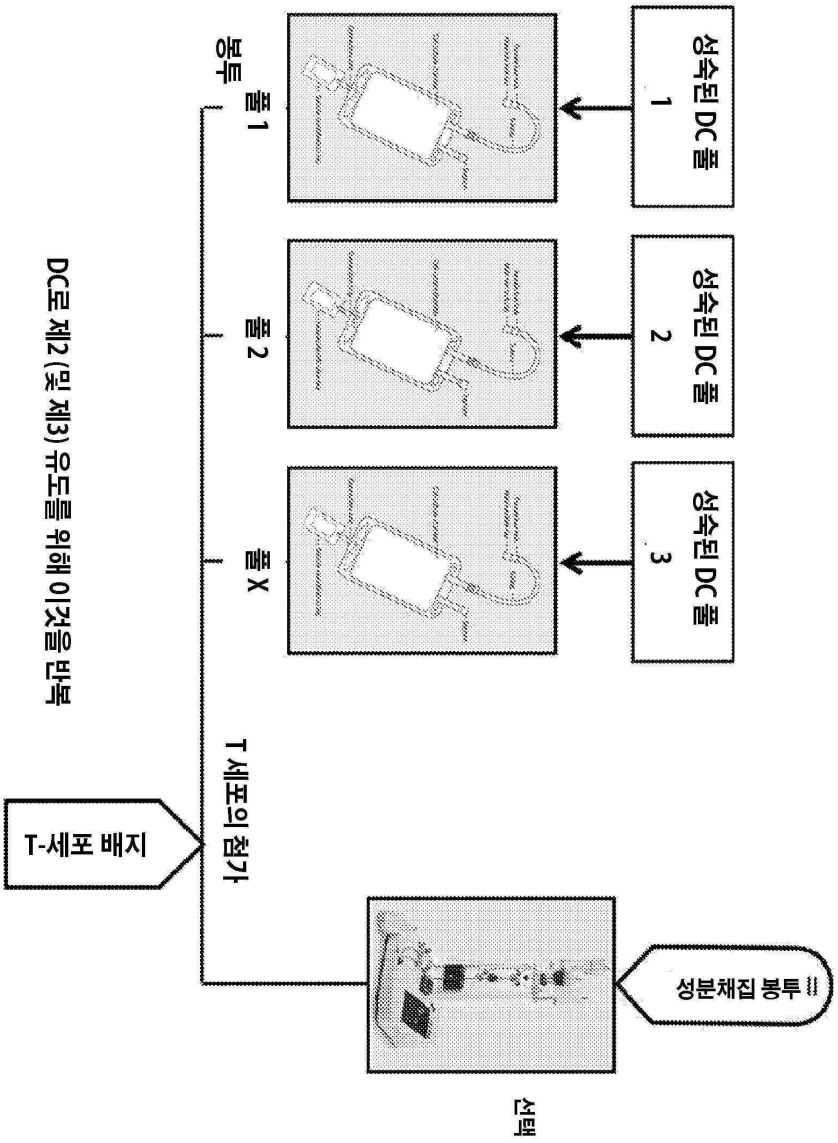

복제물 4
IFNγ+ (CD4+의 %)
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #4 펩티드] (μM)


복제물 4
IFNγ+ (CD4+의 %)
20
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #6 펩티드] (μM)

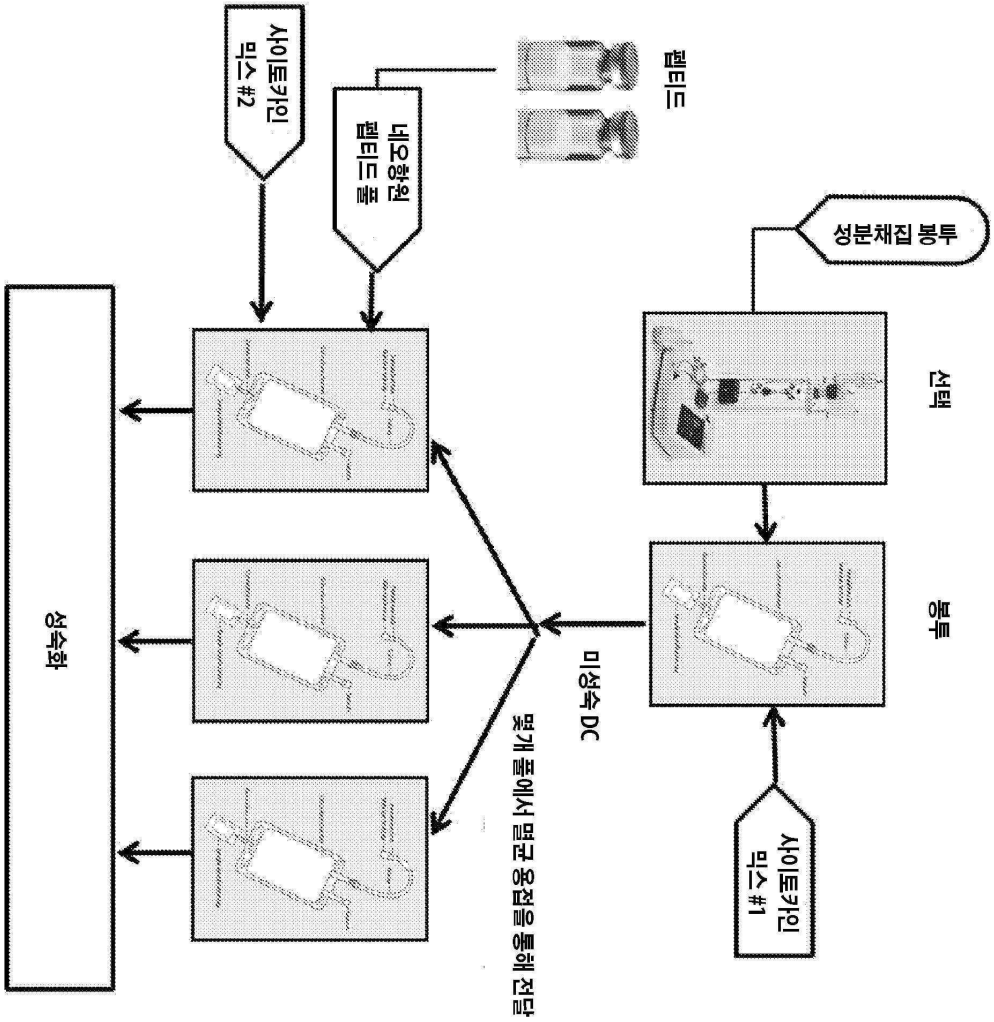
도면31


FLT3L
1-4 일
펩티드 로딩 및 성숙화
7-32 일
프라임
1차 자극
1x 유도된 배양물
FLT3L
1-4 일
펩티드 로딩 및 성숙화
1-4 일
7-32 일
프라임 및 확장
2차 자극
2x 유도된 배양물
FLT3L
1-4 일
펩티드 로딩 및 성숙화
1-4 일
7-32 일
프라임 및 확장
냉동
3차 자극

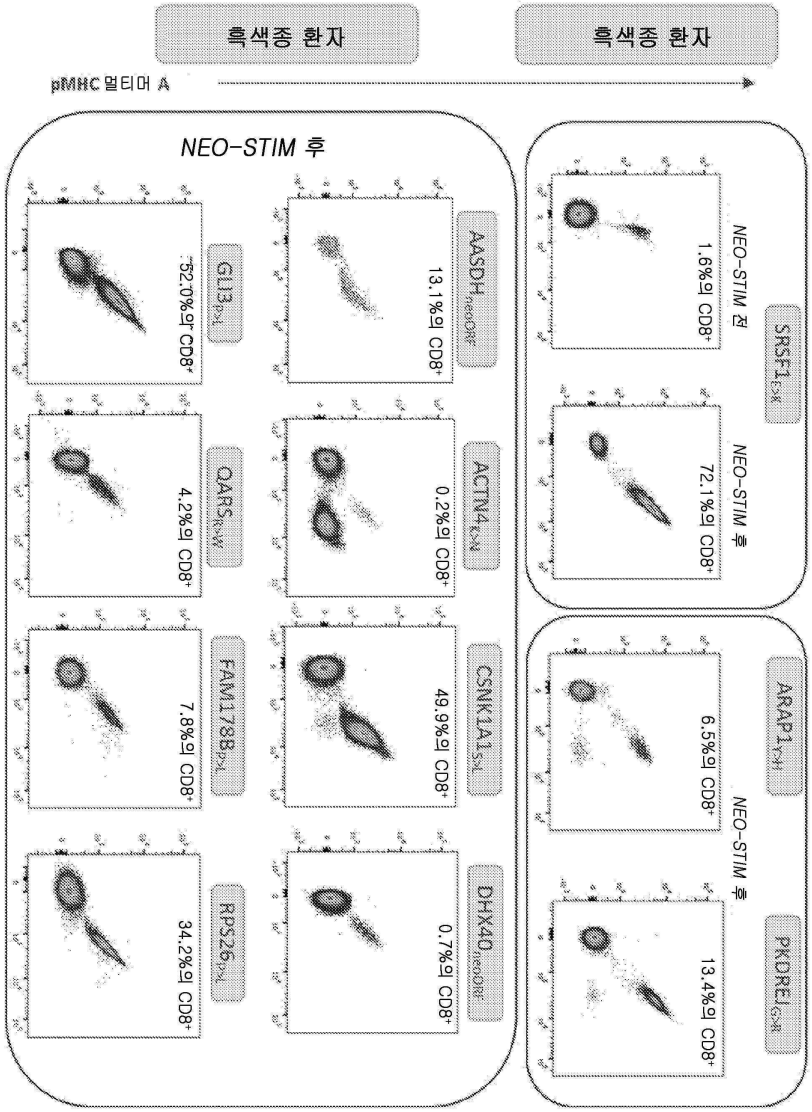
도면32


성숙된 DC 풀 1
성숙된 DC 풀 2
성숙된 DC 풀 3
봉투
풀 1
풀 2
풀 X
DC로 제2 (및 제3) 유도를 위해 이것을 반복
T-세포 배지
T 세포의 첨가
성분채집 봉투
선택

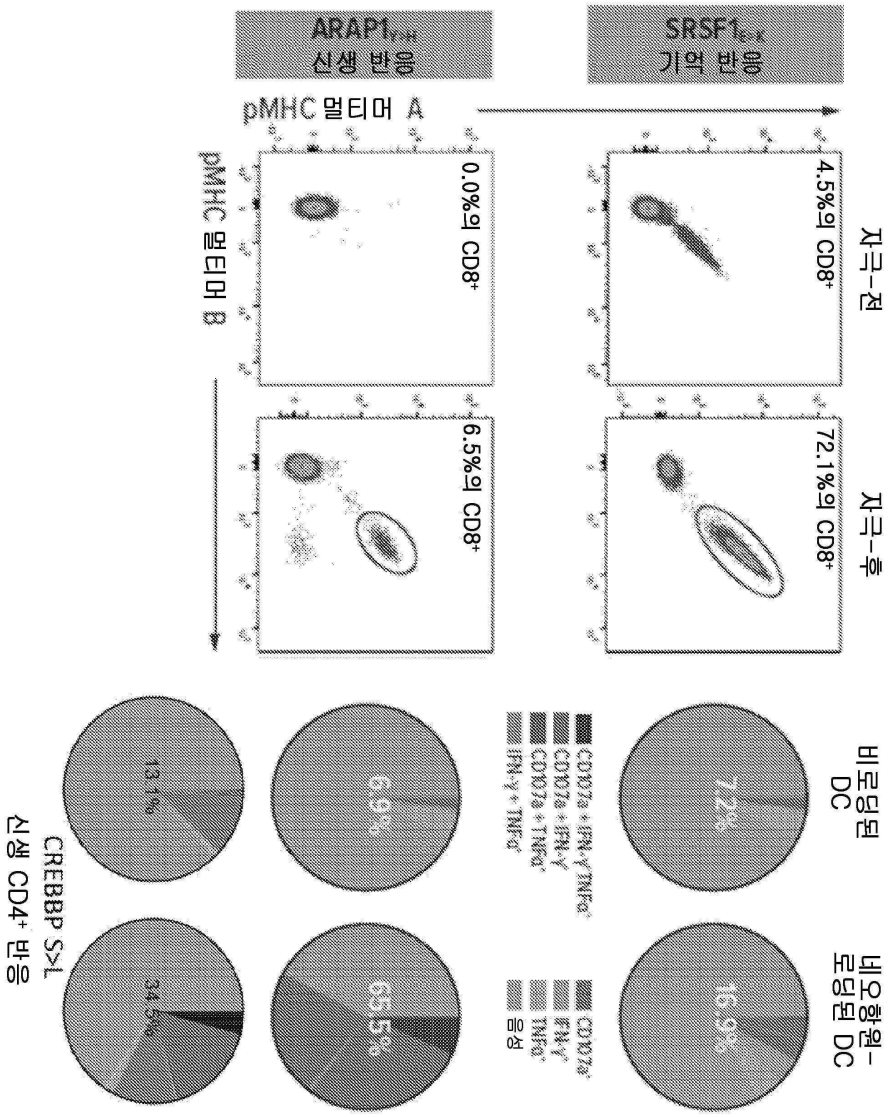
도면33


사이토카인 믹스 #2
네오항원 펩티드 풀
펩티드
성분채집 봉투
성숙화
미성숙 DC
며칠 풀에서 멸균 용접을 통해 전달
사이토카인 믹스 #1

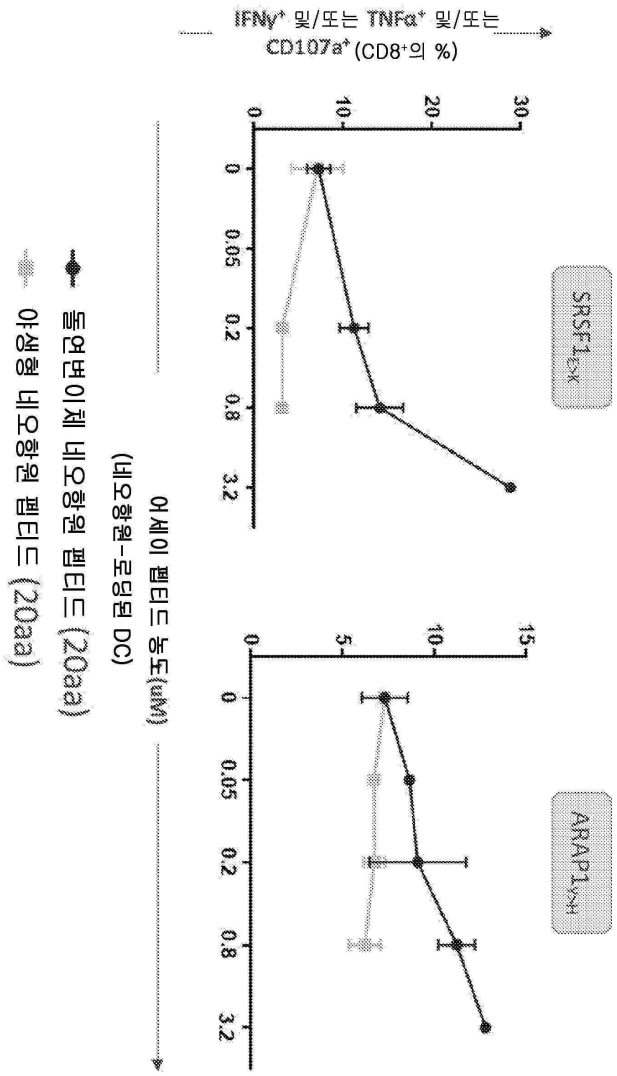
도면34


흑색종 환자
흑색종 환자
pMHC 멀티머 A
NEO-STIM 후
SRSF1E>K
NEO-STIM 전
1.6%의 CD8+
NEO-STIM 후
72.1%의 CD8+
ARAP1Y>H
NEO-STIM 후
6.5%의 CD8+
PKDREJG>R
13.4%의 CD8+
AASDHPREOORF
13.1%의 CD8+
GL13P>L
52.0%의 CD8+
ACTN4K>N
0.2%의 CD8+
QARSK>W
4.2%의 CD8+
CSNK1A1S>L
49.9%의 CD8+
FAM178BP>L
7.8%의 CD8+
DHX40PREOORF
0.7%의 CD8+
RPS26P>L
34.2%의 CD8+

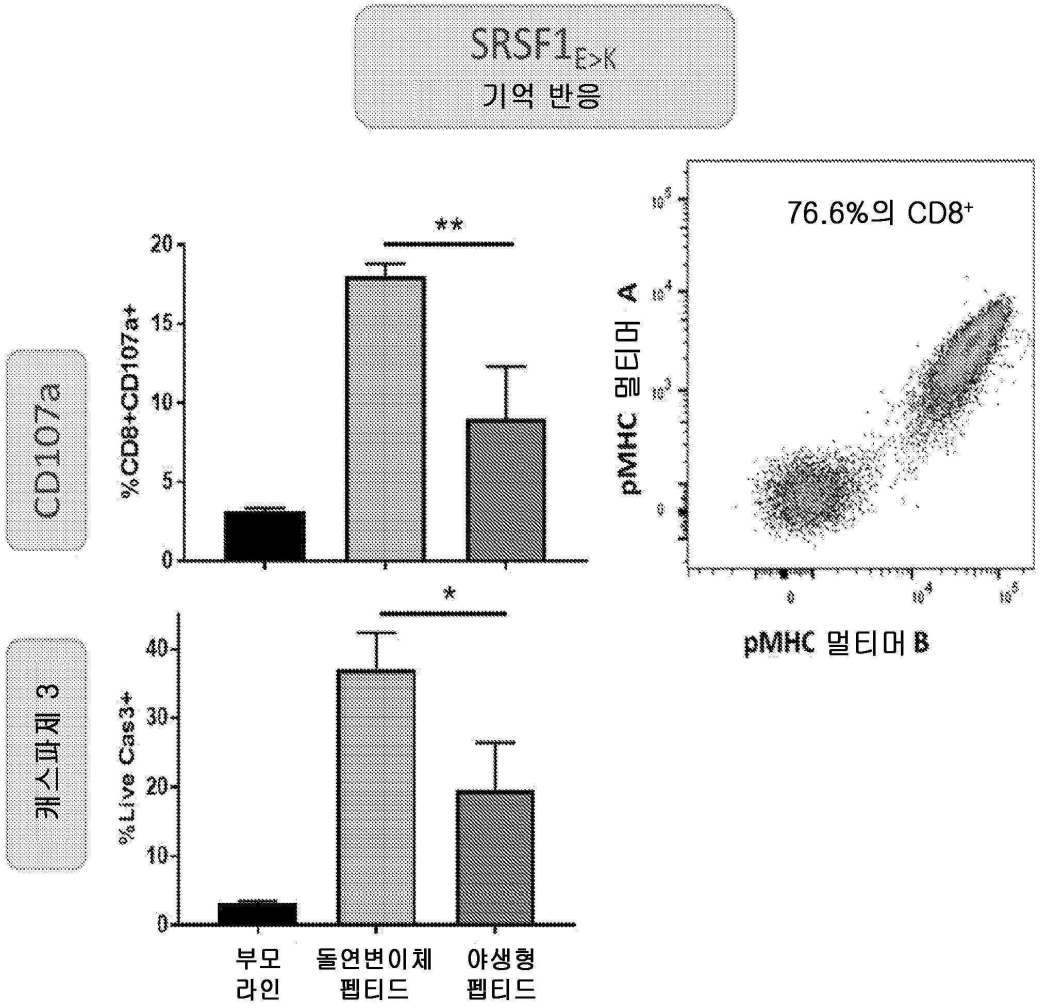
도면35


SRSF1c.-x
기억 반응
ARAP1V.H
신생 반응
pMHC 멀티머 A
pMHC 멀티머 B
4.5%의 CD8+
0.0%의 CD8+
72.1%의 CD8+
6.5%의 CD8+
자극-전
자극-후
비로딩된 DC
네오항원-로딩된 DC
7.2%
6.9%
16.9%
65.5%
13.1%
34.5%
CD107a+IFN-γ+TNFα+
CD107a+IFN-γ-
CD107a+TNFα+
IFN-γ+TNFα+
CD107a+
IFN-γ+
TNFα+
응답
CREBBP S>L
신생 CD4+ 반응

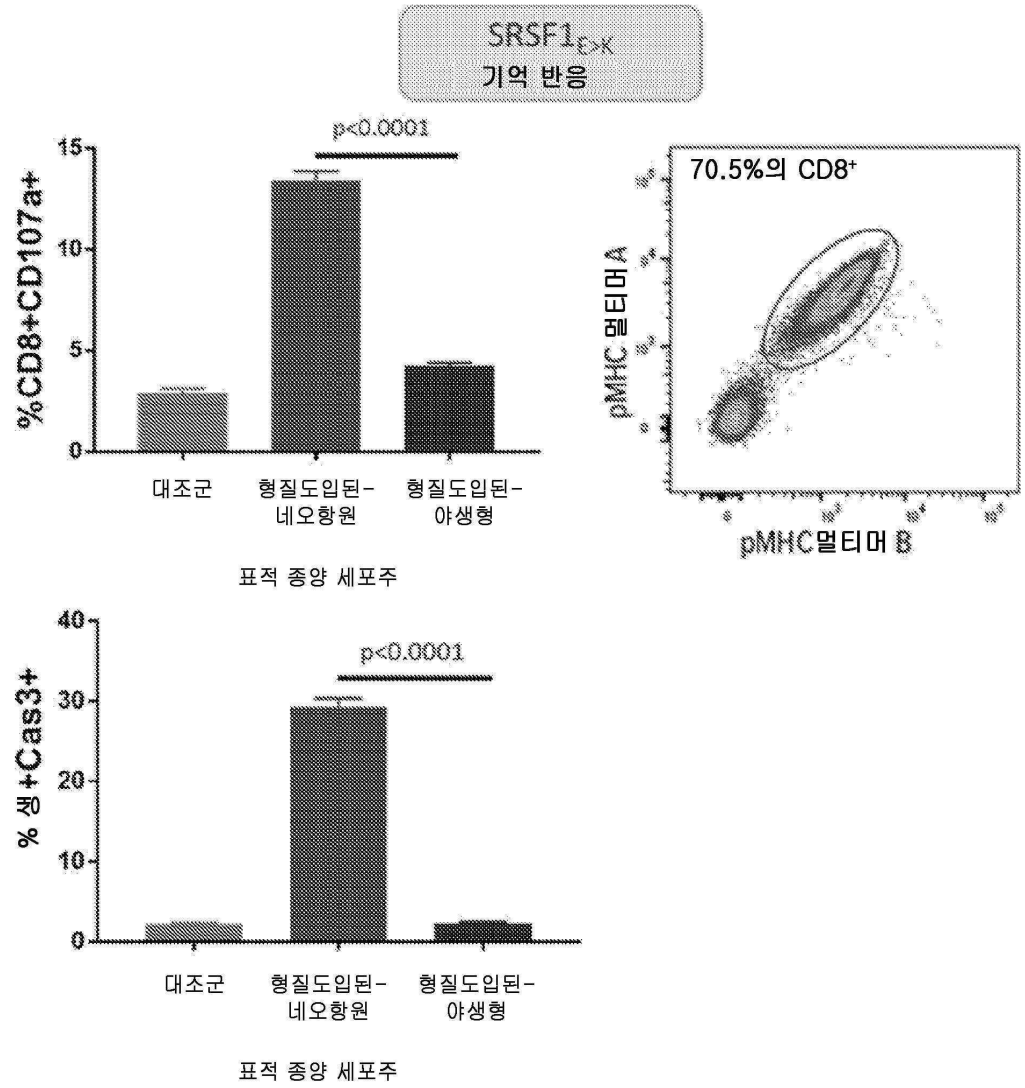
도면36


IFNγ+ 및/또는 TNFα+ 및/또는
CD107a+ (CD8+의 %)
SRSF1-x
ARAP1-H
어세이 펩티드 농도(uM)
(네오항원-로딩된 DC)
돌연변이체 네오항원 펩티드 (20aa)
야생형 네오항원 펩티드 (20aa)

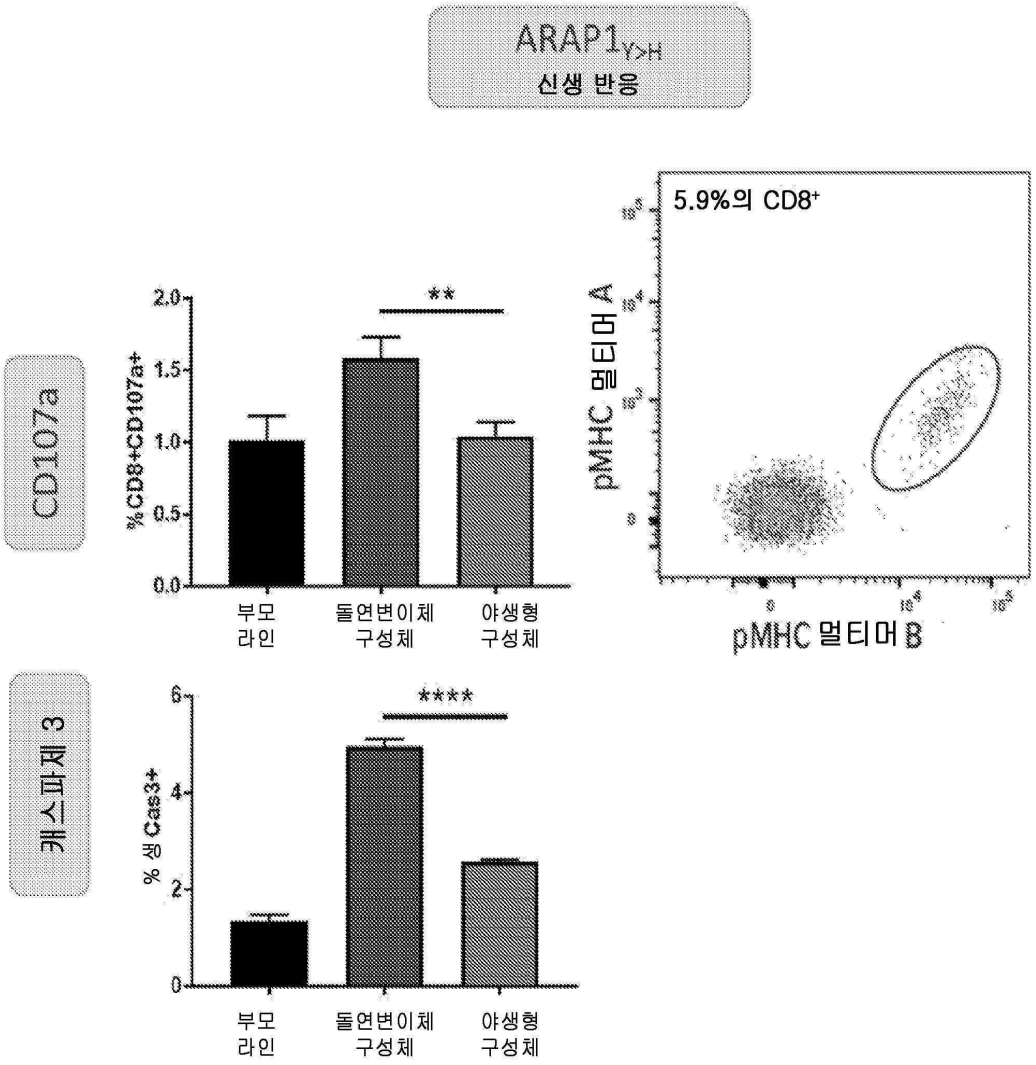
도면37a


SRSF1E>K
기억 반응
CD107a
%CD8+CD107a+
**
20
15
10
5
0
76.6%의 CD8+
pMHC 멀티머 A
pMHC 멀티머 B
케스파제 3
%Live Cas3+
*
40
30
20
10
0
부모 라인
돌연변이체 펩티드
야생형 펩티드

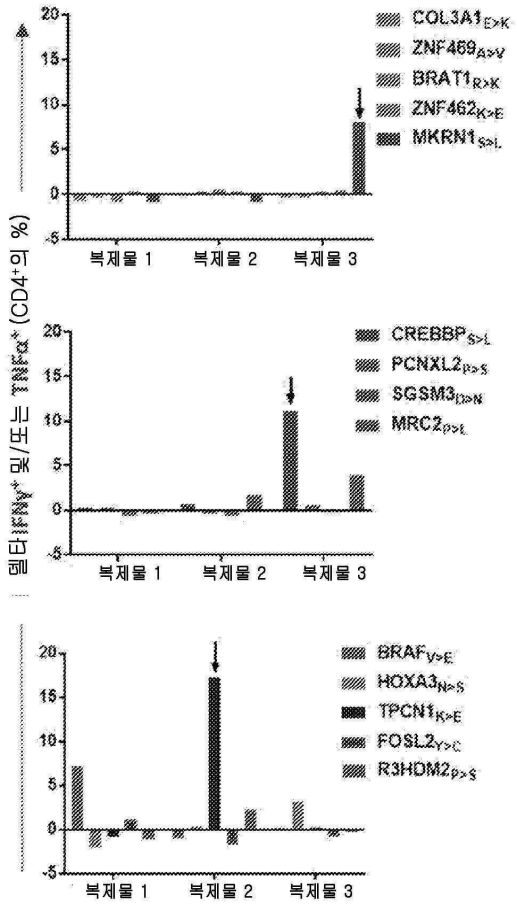
도면37b


SRSF1E>K
기억 반응
p<0.0001
%CD8+CD107a+
15
10
5
0
대조군
형질도입된-
네오항원
형질도입된-
야생형
표적 종양 세포주
70.5%의 CD8+
pMHC 멀티머 A
pMHC멀티머 B
p<0.0001
% 생+Cas3+
40
30
20
10
0
대조군
형질도입된-
네오항원
형질도입된-
야생형
표적 종양 세포주

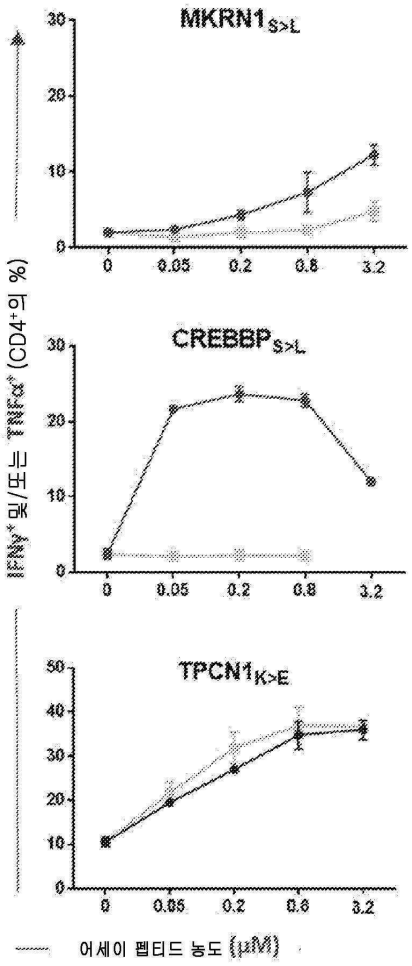
도면37c


ARAP1Y>H
신생 반응
CD107a
%CD8+CD107a+
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
부모 라인
돌연변이체 구성체
야생형 구성체
5.9%의 CD8+
pMHC 멀티머 A
pMHC 멀티머 B
캐스파제 3
% 생 Cas3+
6
4
2
0
****
부모 라인
돌연변이체 구성체
야생형 구성체

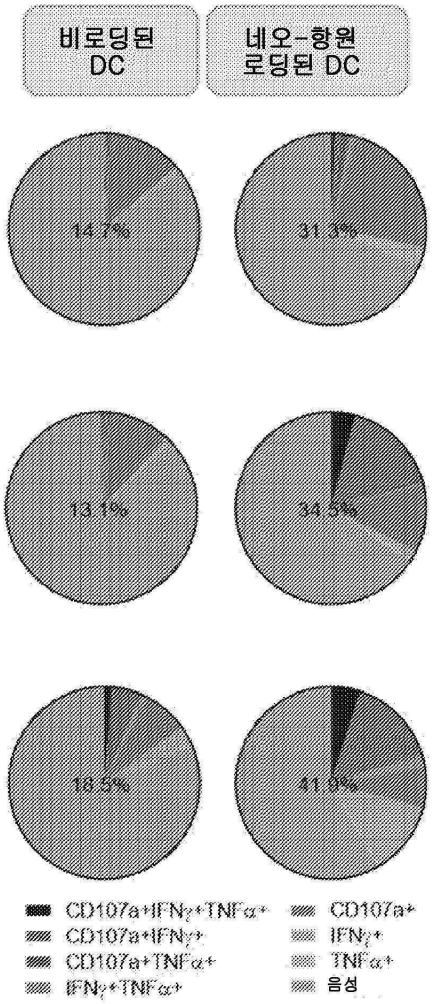
도면38a


델타 IFNγ+ 및/또는 TNFα+ (CD4+의 %)
COL3A1E>K
ZNF469A>V
BRAT1R>K
ZNF462K>E
MKRN1S>L
CREBBPS>L
PCNXL2P>S
SGSM3D>N
MRC2P>L
BRAFV>E
HOXA3N>S
TPCN1K>E
FOSL2Y>C
R3HDM2P>S
복제물 1
복제물 2
복제물 3

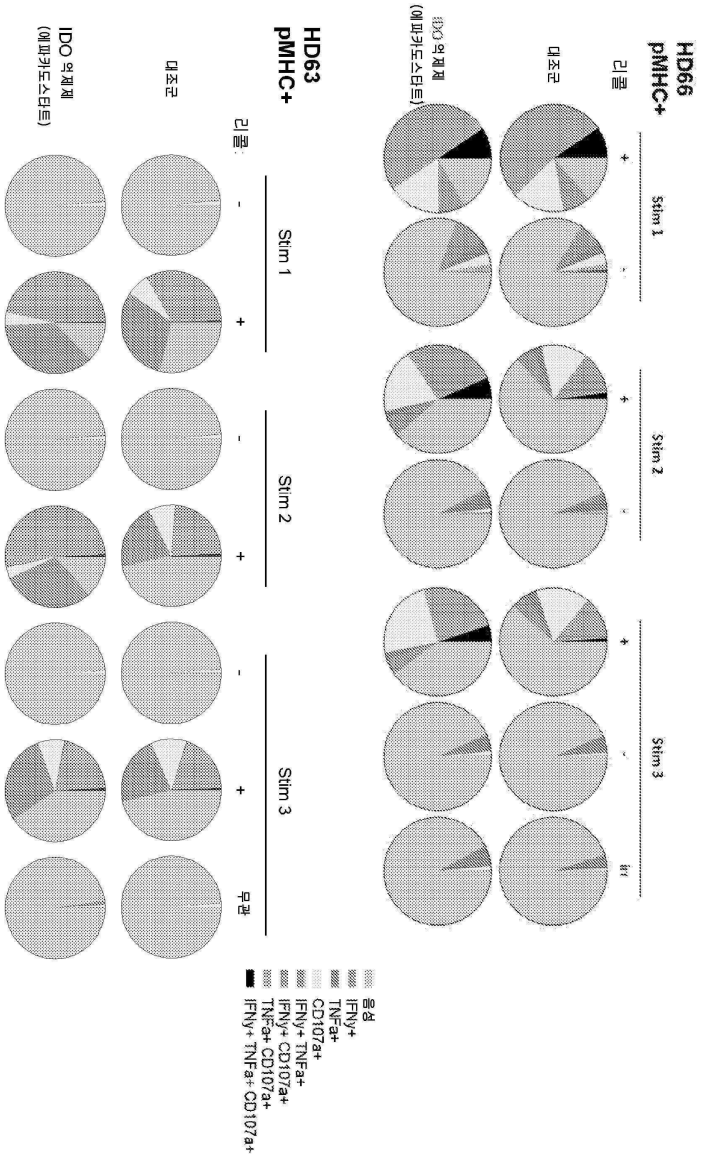
도면38b


MKRN1S>L
CREBBPS>L
TPCN1K>E
IFNγ+ 및/또는 TNFα+ (CD4+의 %)
어세이 펩티드 농도 (μM)
0
0.05
0.2
0.8
3.2

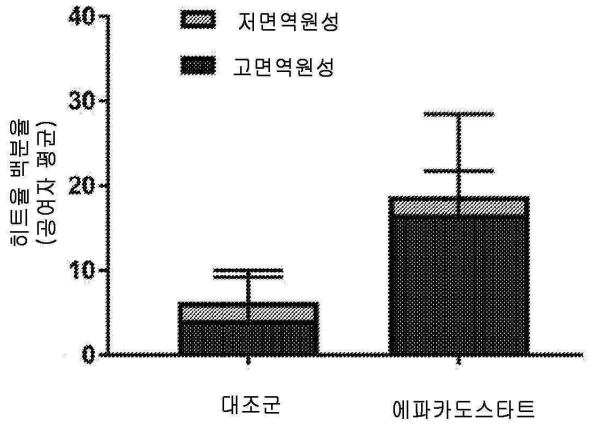
도면38c


비로딩된 DC
네오-항원 로딩된 DC
14.7%
31.3%
13.1%
34.5%
16.5%
41.8%
CD107a+IFNγ+TNFα+
CD107a+IFNγ+
CD107a+TNFα+
IFNγ+TNFα+
CD107a+
IFNγ+
TNFα+
음성

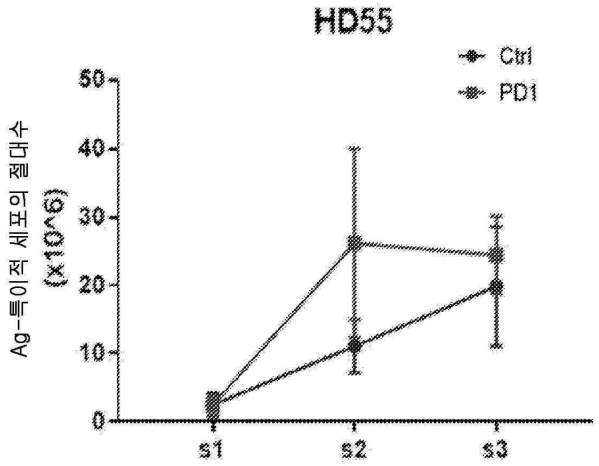
도면39


HD66
pMHC+
리콜
대조군
IDO 억제제
(에파카도스타트)
Stim 1
Stim 2
Stim 3
HD63
pMHC+
리콜
대조군
IDO 억제제
(에파카도스타트)
Stim 1
Stim 2
Stim 3
무관
IFNγ+
TNFa+
CD107a+
IFNγ+ TNFa+
IFNγ+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNγ+ TNFa+ CD107a+

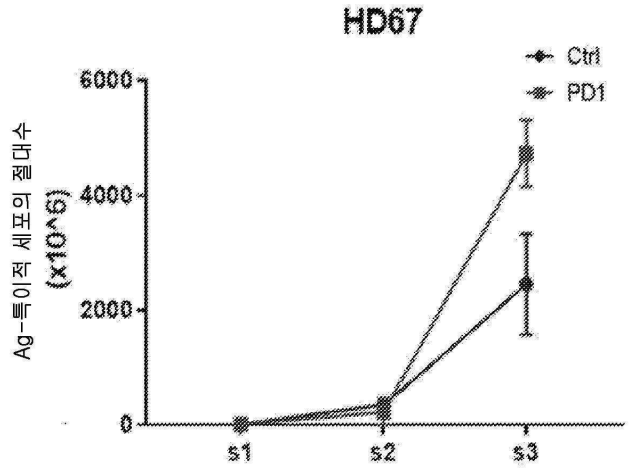
도면40


저면역원성
고면역원성
히트맵 음물분 (공여자 평균)
40
30
20
10
0
대조군
에파카도스타트

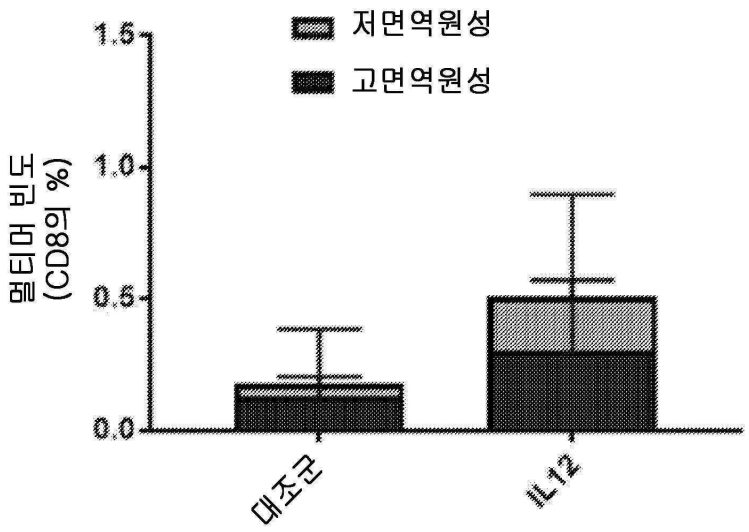
도면41a



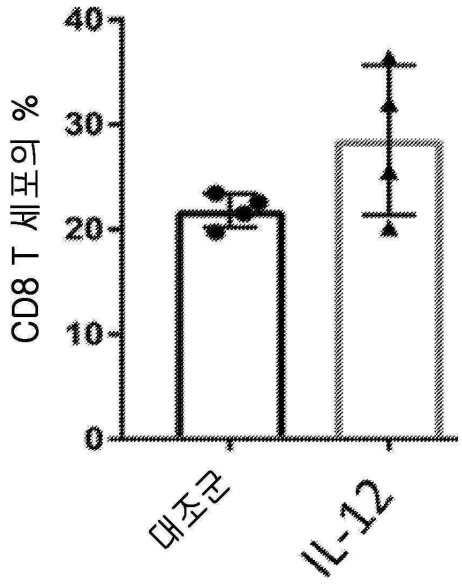
도면41b



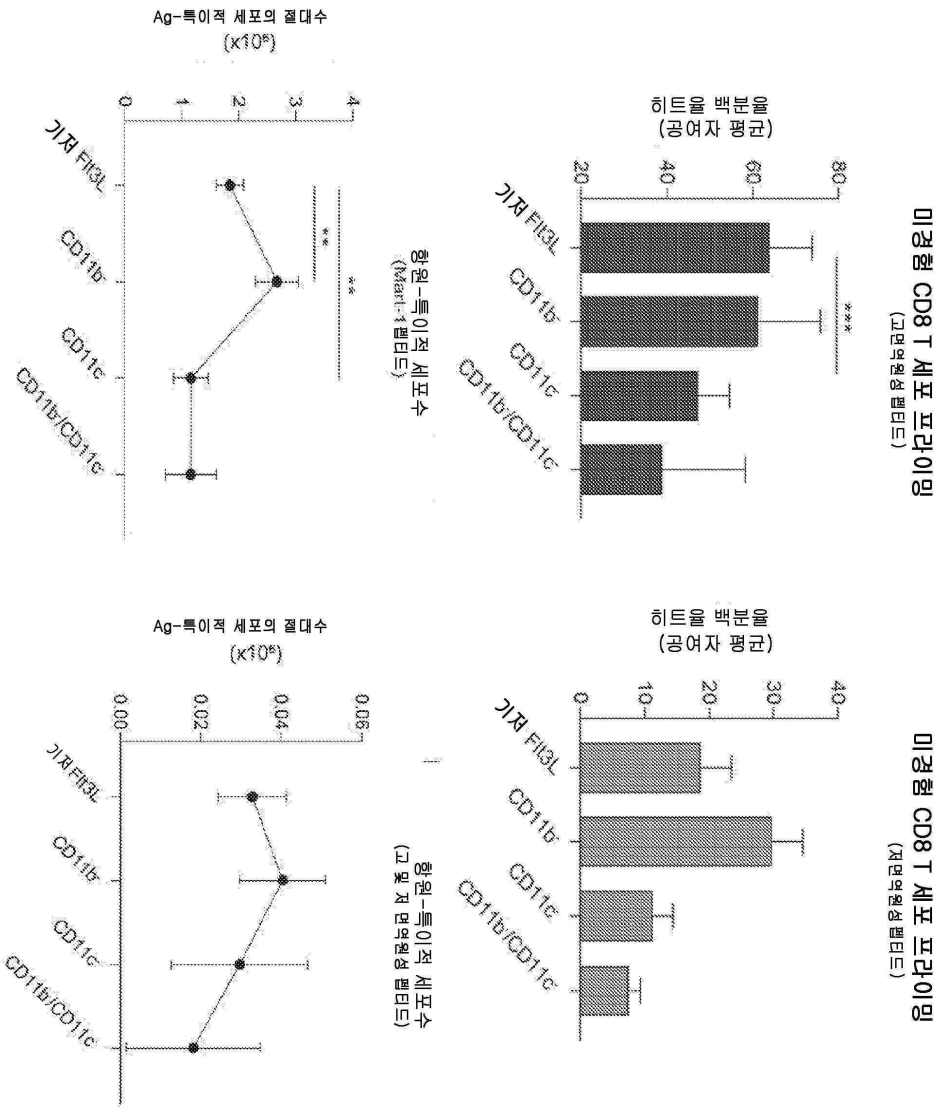
도면42a



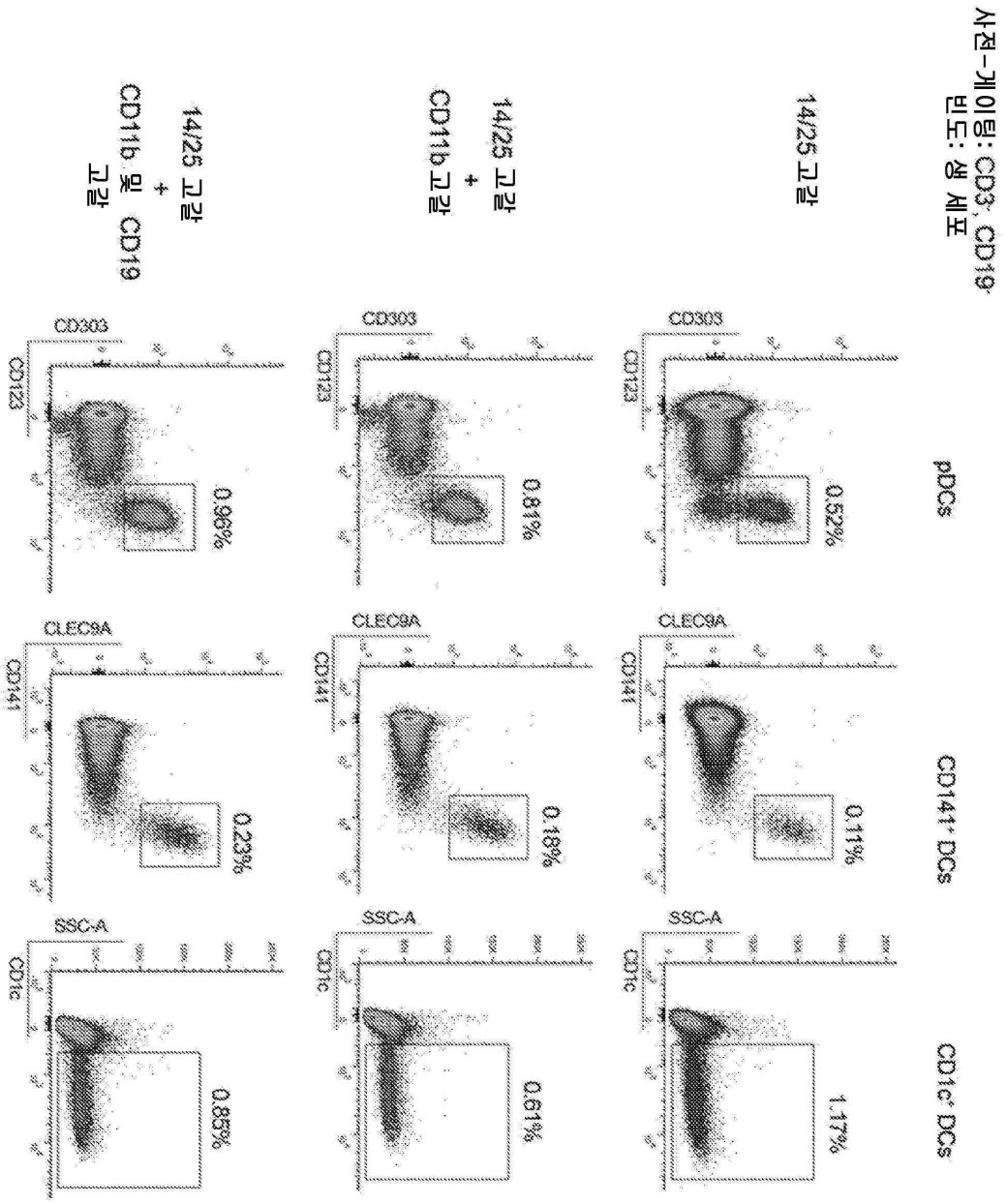
도면42b



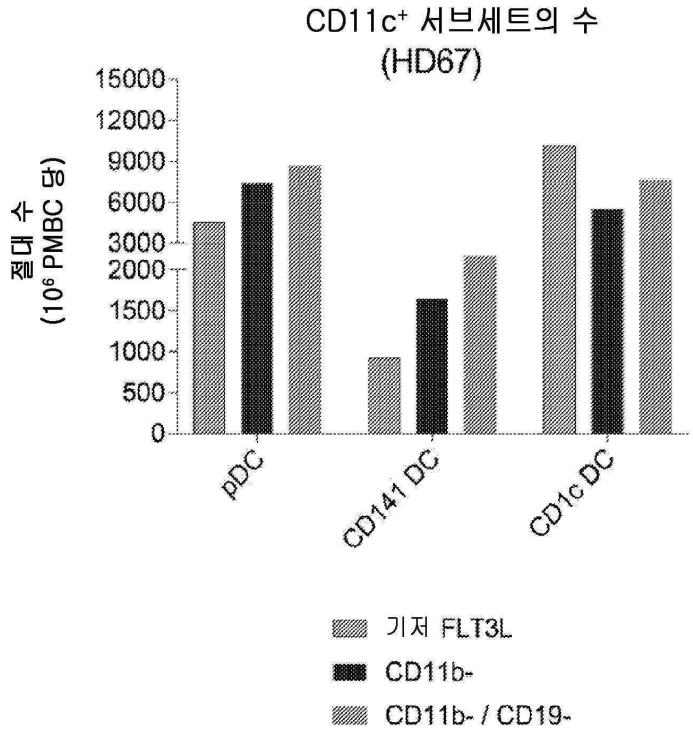
도면43


미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(교차제시 항원 펄스 BMDC)
히트율 백분율
(공여자 평균)
기저 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c
항원-특이적 세포수
(Mart-1펄스 BMDC)
Ag-특이적 세포의 절대수
(x10⁶)
미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(교차제시 항원 펄스 BMDC)
히트율 백분율
(공여자 평균)
기저 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c
항원-특이적 세포수
(교차제시 항원 펄스 BMDC)
Ag-특이적 세포의 절대수
(x10⁶)

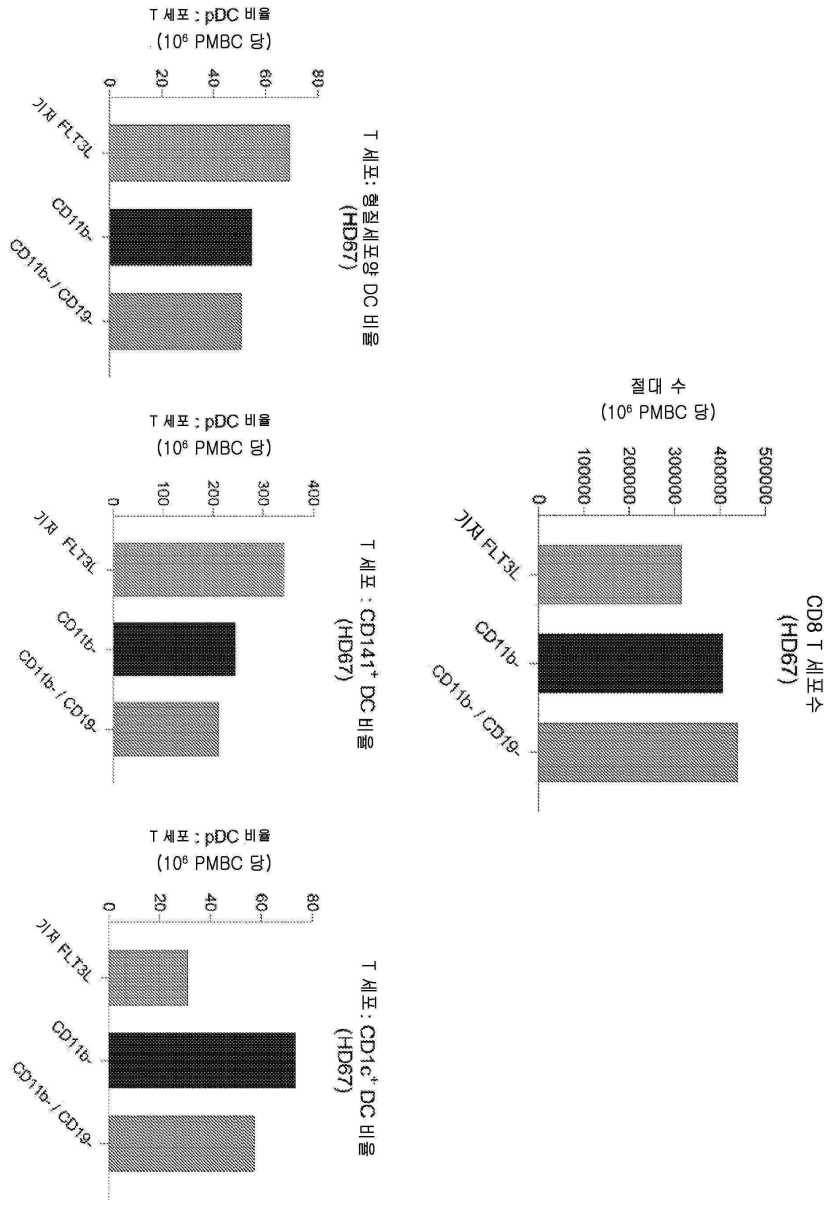
도면44a


사전-게이팅: CD3⁻, CD19⁻
빈도: 생 세포
14/25 고갈
14/25 고갈 + CD11b고갈
14/25 고갈 + CD11b 및 CD19 고갈
pDCs
CD141⁺ DCs
CD1c⁺ DCs
CD303
CD123
CLEC9A
CD141
SSC-A
CD1c
0.52%
0.11%
1.17%
0.81%
0.18%
0.61%
0.96%
0.23%
0.85%

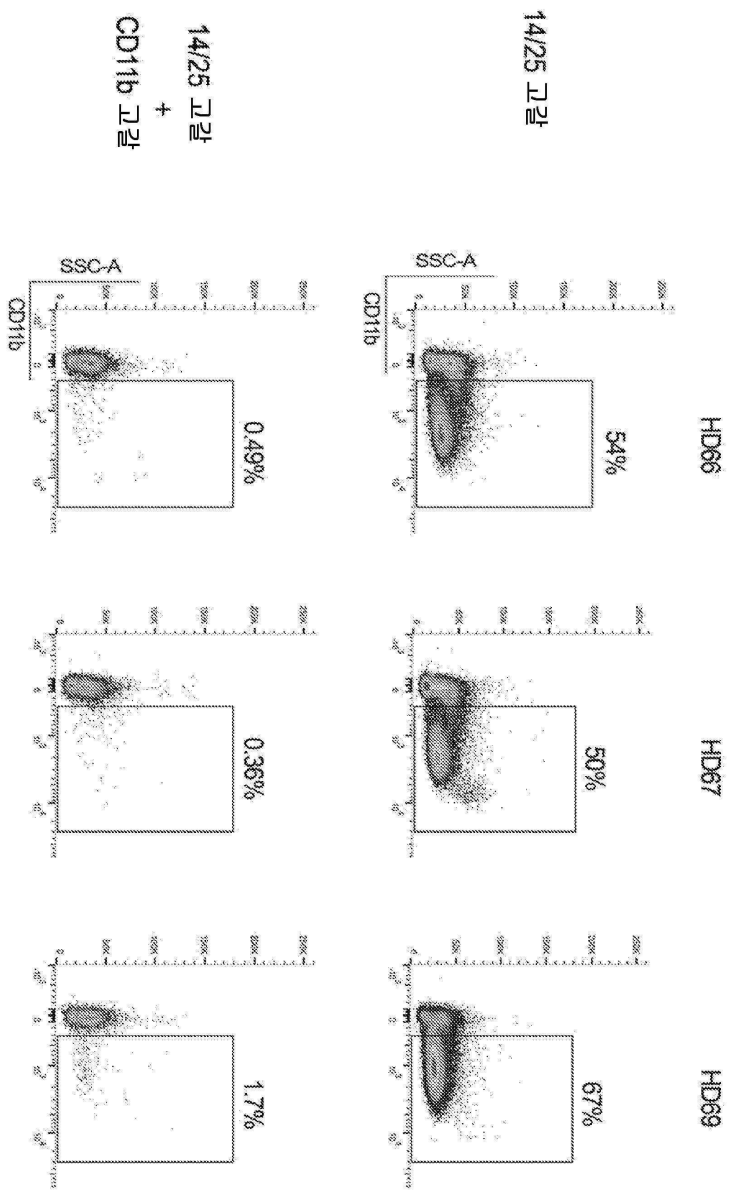
도면44b


CD11c+ 서브세트의 수
(HD67)
절대 수
(10⁶ PMBC 당)
15000
12000
9000
6000
3000
2000
1500
1000
500
0
pDC
CD141 DC
CD1c DC
기저 FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-

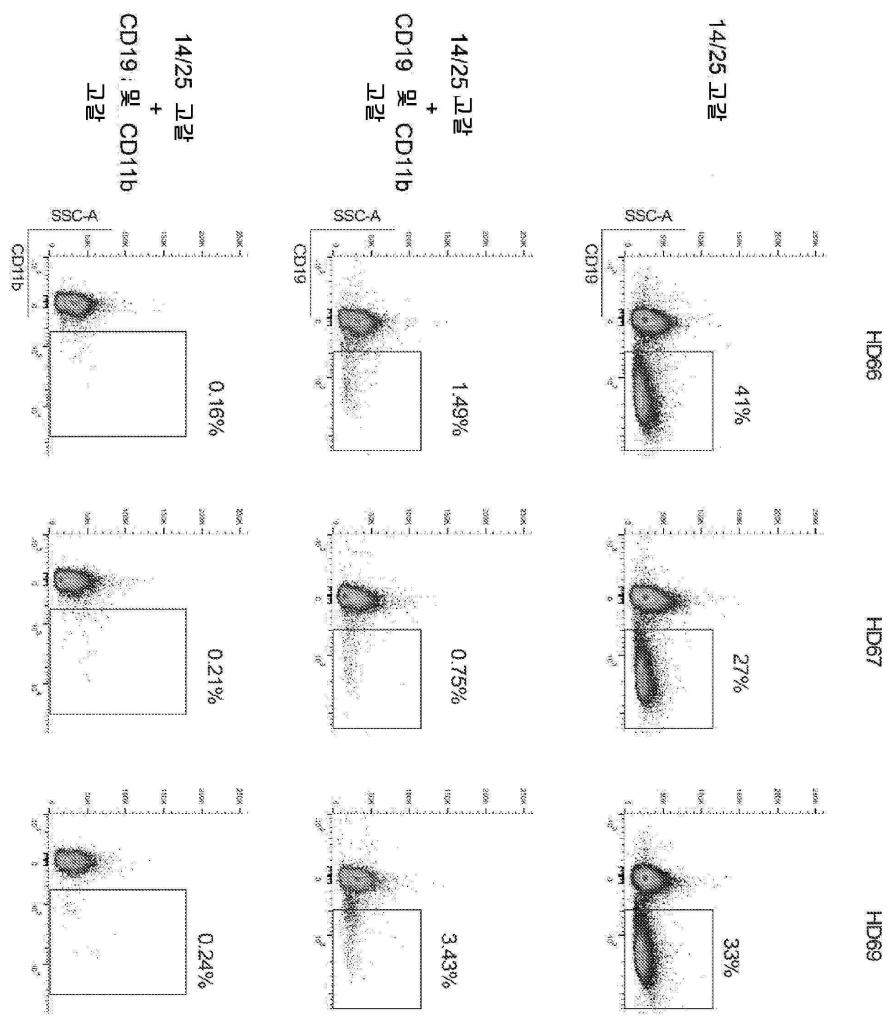
도면45


T 세포 : pDC 비율
(10⁶ PMBC 당)
0
20
40
60
80
기저
FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-
T 세포 : 혈장세포양 DC 비율
(HD67)
T 세포 : pDC 비율
(10⁶ PMBC 당)
0
100
200
300
400
기저
FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-
T 세포 : CD141+ DC 비율
(HD67)
T 세포 : pDC 비율
(10⁶ PMBC 당)
0
20
40
60
80
기저
FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-
T 세포 : CD16+ DC 비율
(HD67)
절대 수
(10⁶ PMBC 당)
0
100000
200000
300000
400000
500000
기저
FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-
CD8 T 세포수
(HD67)

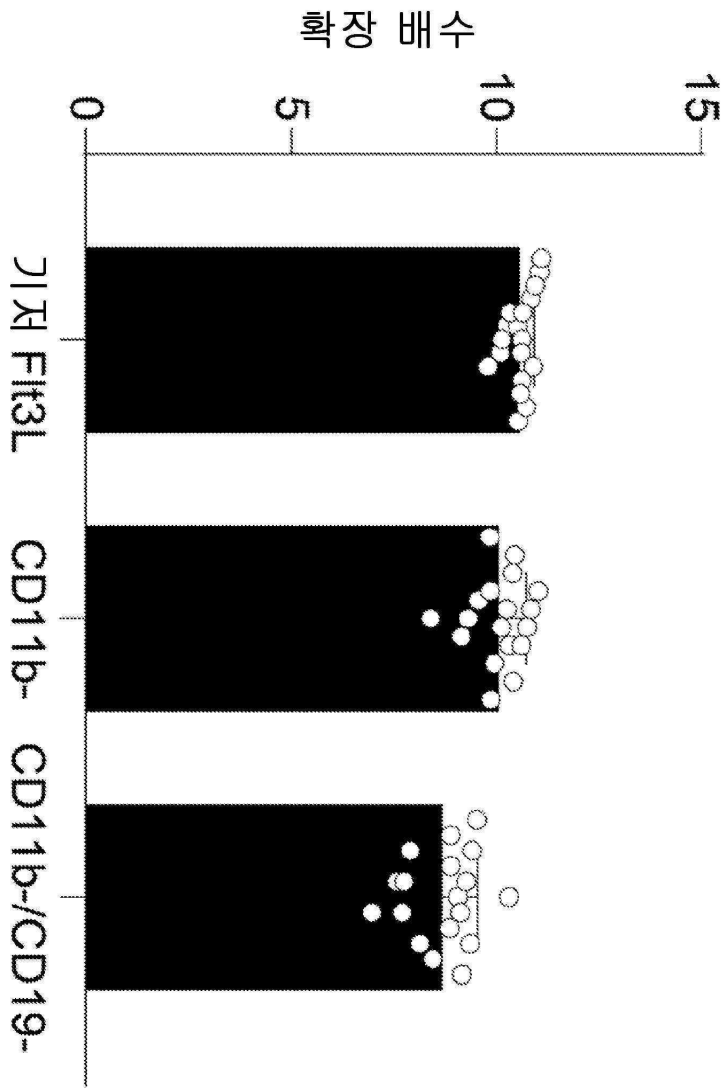
도면46


14/25 고갈
14/25 고갈 + CD11b 고갈
SSC-A
CD11b
54%
0.49%
HD66
50%
0.36%
HD67
67%
1.7%
HD69

도면47


14/25 고갈
14/25 고갈 + CD19 및 CD11b 고갈
14/25 고갈 + CD19 및 CD11b 고갈
HD66
HD67
HD69
SSC-A
CD19
CD11b
41%
27%
33%
1.49%
0.75%
3.43%
0.16%
0.21%
0.24%

도면48



도면49a

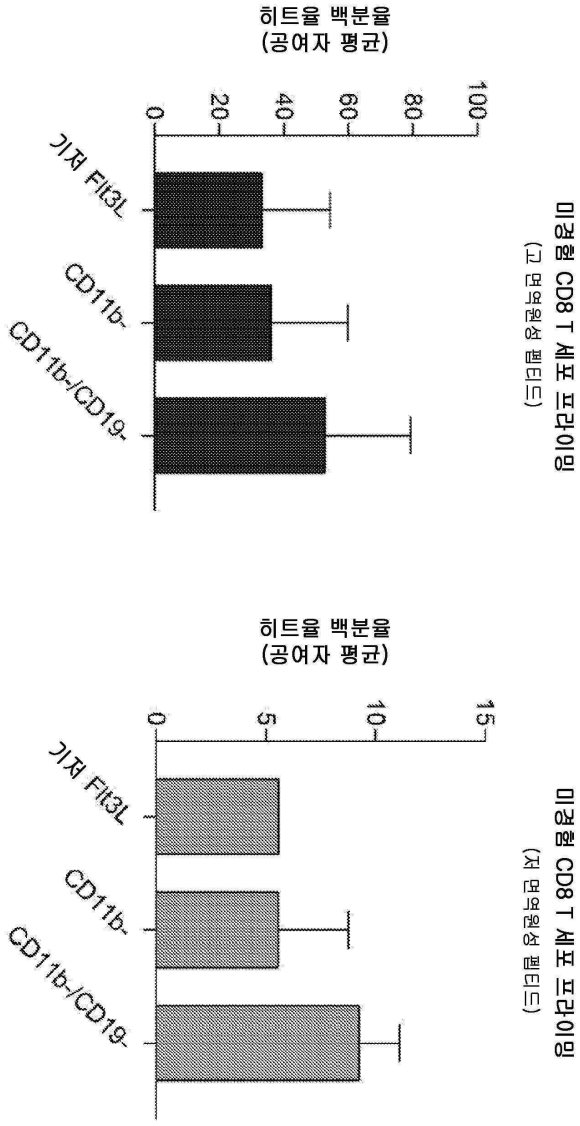
펩타이드 A			1/6
펩타이드 B	2/6	2/6	5/6
ACTN4	1/6		
HIV3		1/6	2/6
CSNK1A1			
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-
	HD66		

펩타이드 A	5/6	5/6	6/6
펩타이드 B	4/6	5/6	6/6
ACTN4			
HIV3		2/6	2/6
CSNK1A1	1/6		
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-
	HD67		

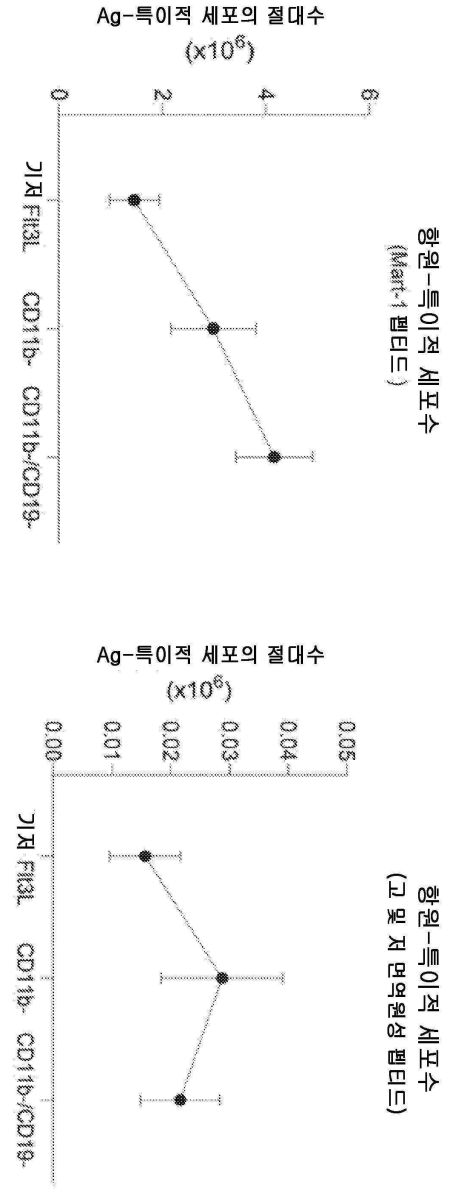
Peptide A	1/6		
Peptide B		1/6	1/6
ACTN4	1/6		
HIV3			
CSNK1A1			1/6
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-
	HD69		

미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(고 및 저 면역원성 펩타이드)

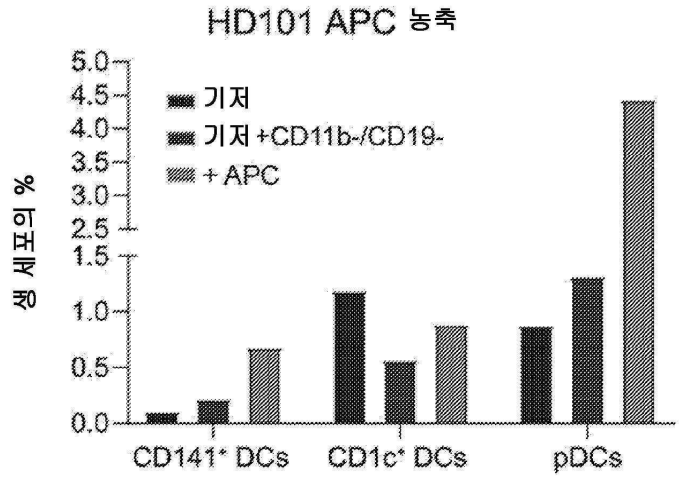
도면49b


히트율 백분율
(공여자 평균)
0
20
40
60
80
100
기저 Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-
미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(고 면역원성 펩티드)
히트율 백분율
(공여자 평균)
0
5
10
15
기저 Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-
미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(저 면역원성 펩티드)

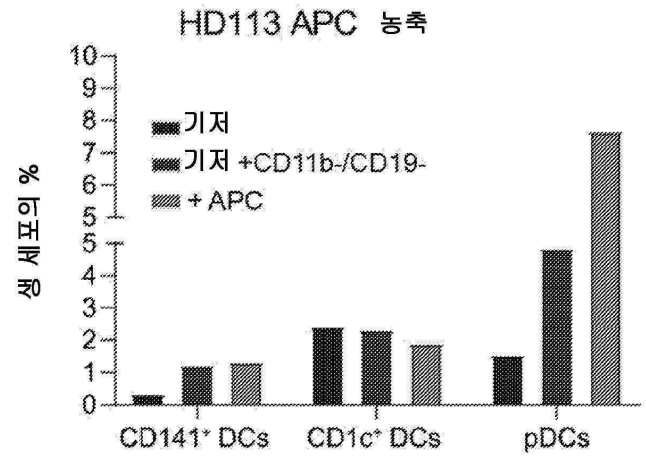
도면50


항원-특이적 세포수
(Mart-1 펩티드)
Ag-특이적 세포의 절대수
(x10^6)
0
2
4
6
기저
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-
항원-특이적 세포수
(고 및 저 면역원성 펩티드)
Ag-특이적 세포의 절대수
(x10^6)
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
기저
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-

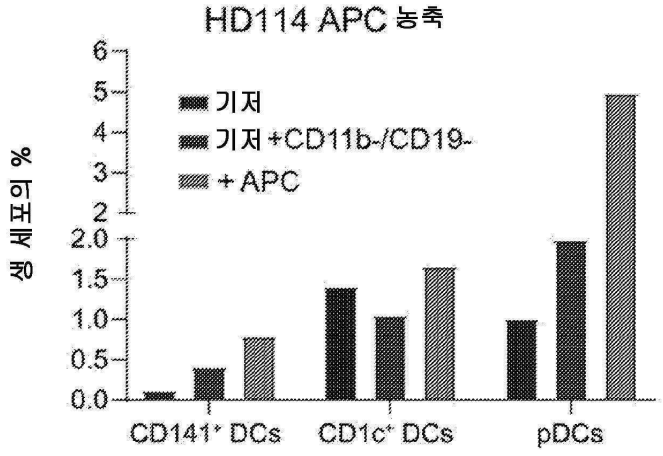
도면51a



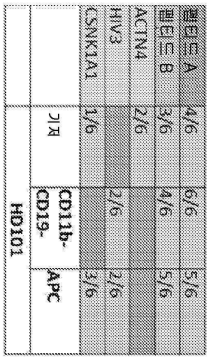
도면51b



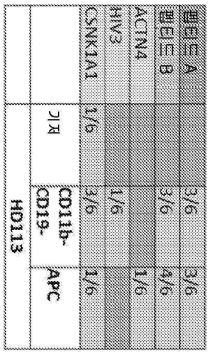
도면51c



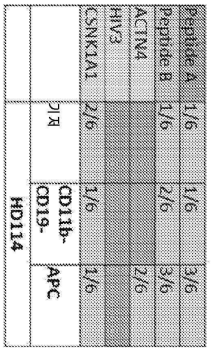
도면51d



		펩타이드 A	4/6	6/6	5/6
		펩타이드 B	3/6	4/6	5/6
		ACTN4	2/6		
		HIV3			
		CSNK1A1	1/6	2/6	2/6
HD101	기저				
	CD11b-CD19-				
	APC				

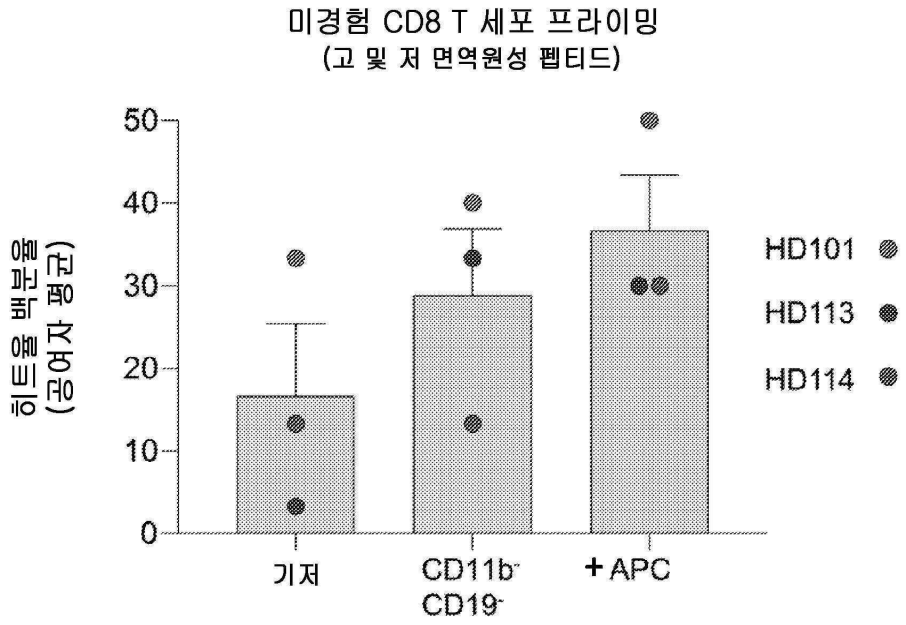


		펩타이드 A		3/6	3/6
		펩타이드 B		3/6	4/6
		ACTN4			1/6
		HIV3		1/6	
		CSNK1A1	1/6	3/6	1/6
HD113	기저				
	CD11b-CD19-				
	APC				

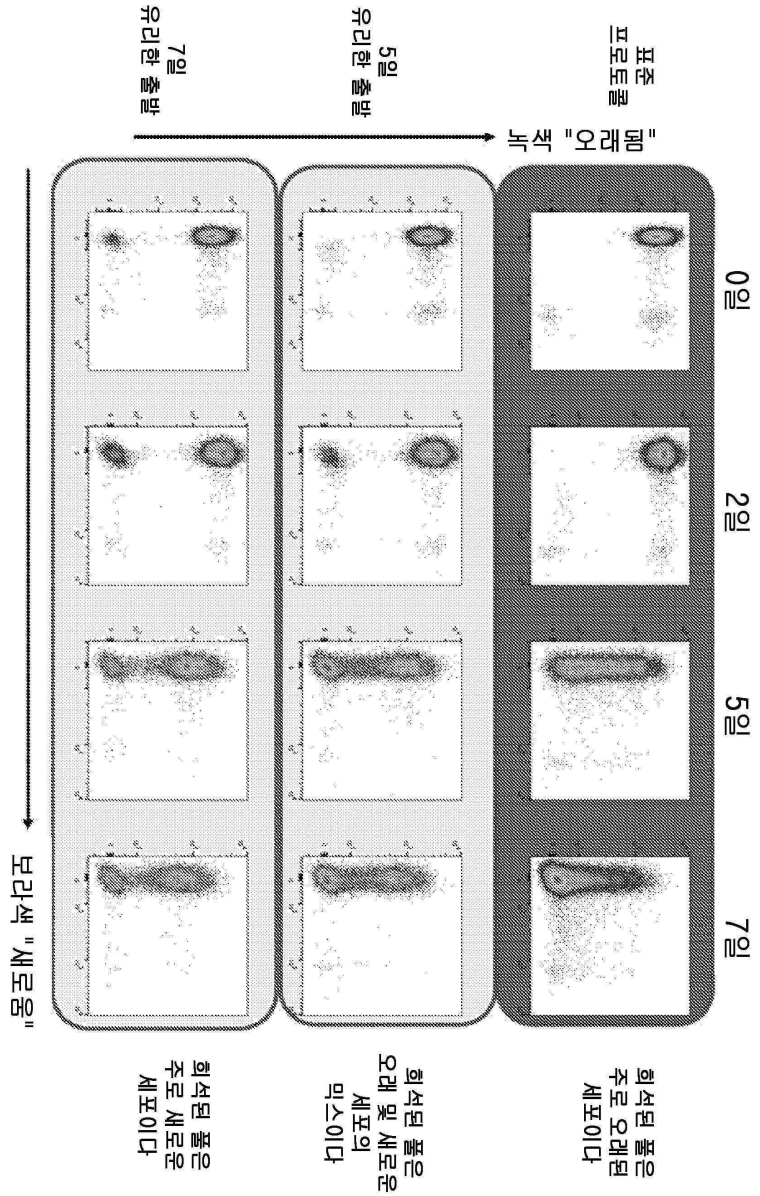


		Peptide A	1/6	1/6	3/6
		Peptide B	1/6	2/6	3/6
		ACTN4			2/6
		HIV3			
		CSNK1A1	2/6	1/6	1/6
HD114	기저				
	CD11b-CD19-				
	APC				

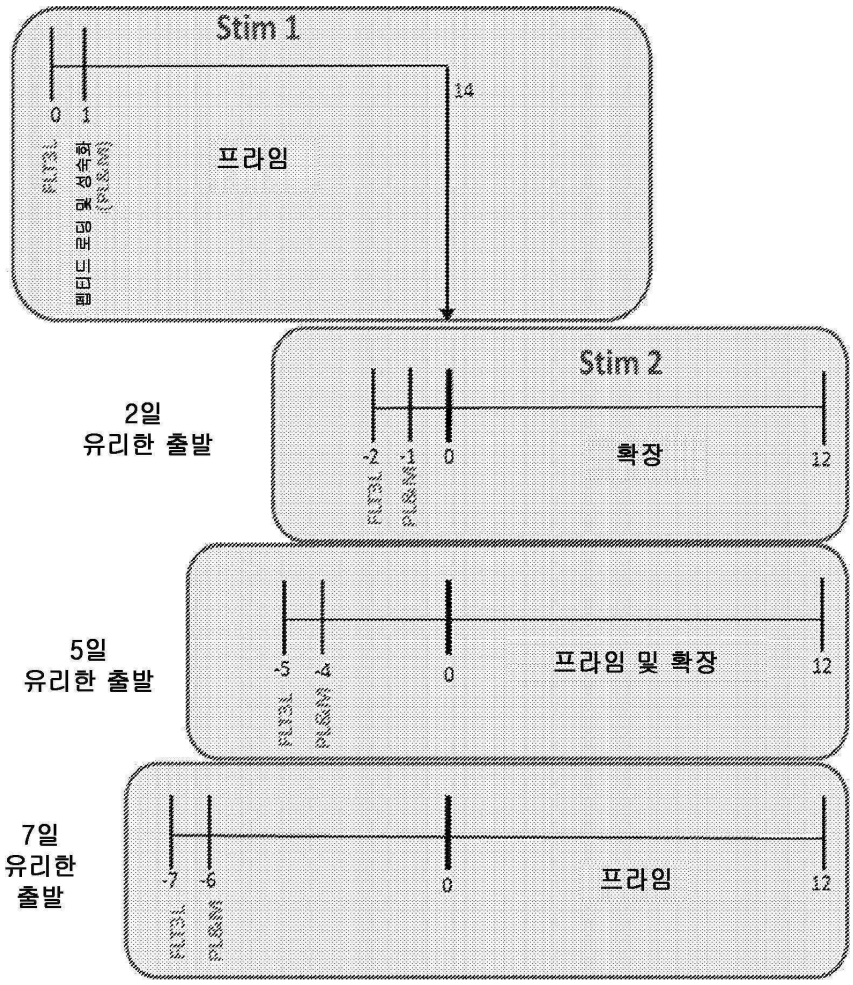
도면51e


미경험 CD8 T 세포 프라이밍
(고 및 저 면역원성 펩티드)
히트을 백분율
(공여자 평균)
50
40
30
20
10
0
기저
CD11b-
CD19-
+ APC
HD101
HD113
HD114

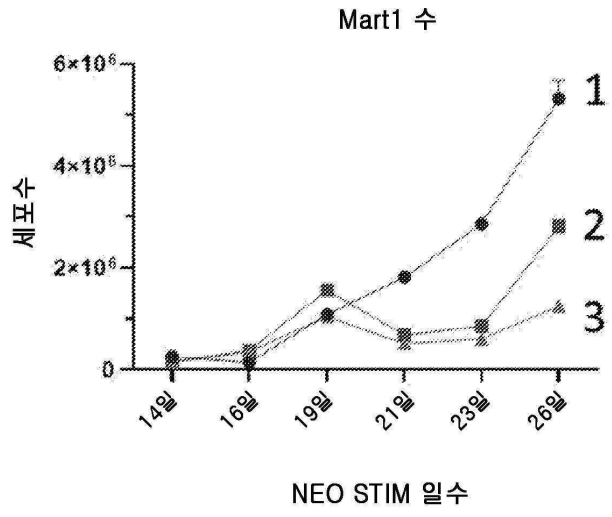
도면52a


표준 프로토콜
"맹란오" 착목
5일 유리한 출발
7일 유리한 출발
0일
2일
5일
7일
목적 "세포 옮김"
희석된 표준 오래된 세포이다
희석된 표준 옮김 및 새로운 세포이다
희석된 표준 옮김 및 새로운 세포이다

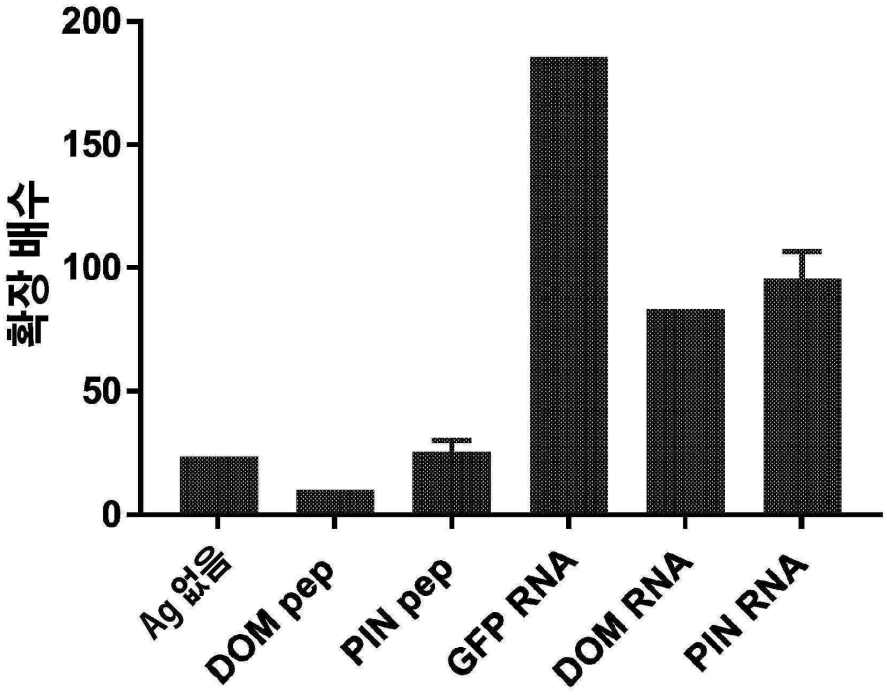
도면52b


Stim 1
0
1
14
프라임
2일
유리한 출발
Stim 2
-2
-1
0
확장
12
5일
유리한 출발
-5
-4
0
프라임 및 확장
12
7일
유리한
출발
-7
-6
0
프라임
12

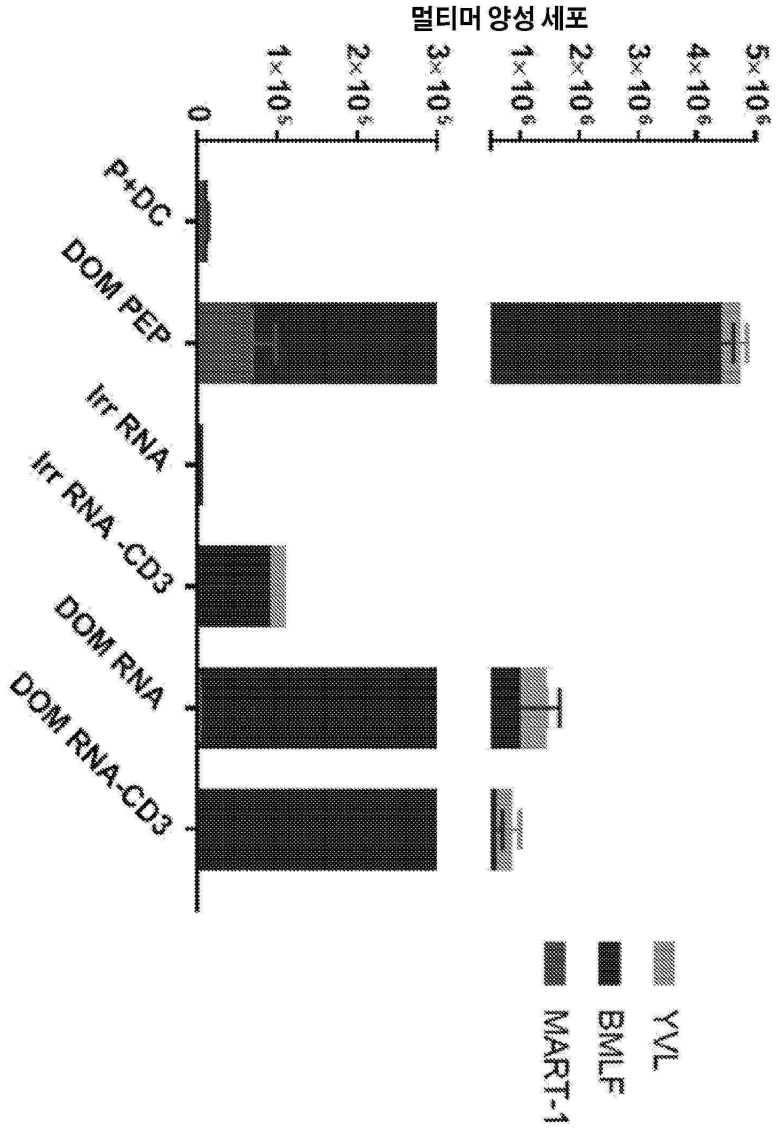
도면52c


Mart1 수
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
1
2
3
14일
16일
19일
21일
23일
26일
NEO STIM 일수

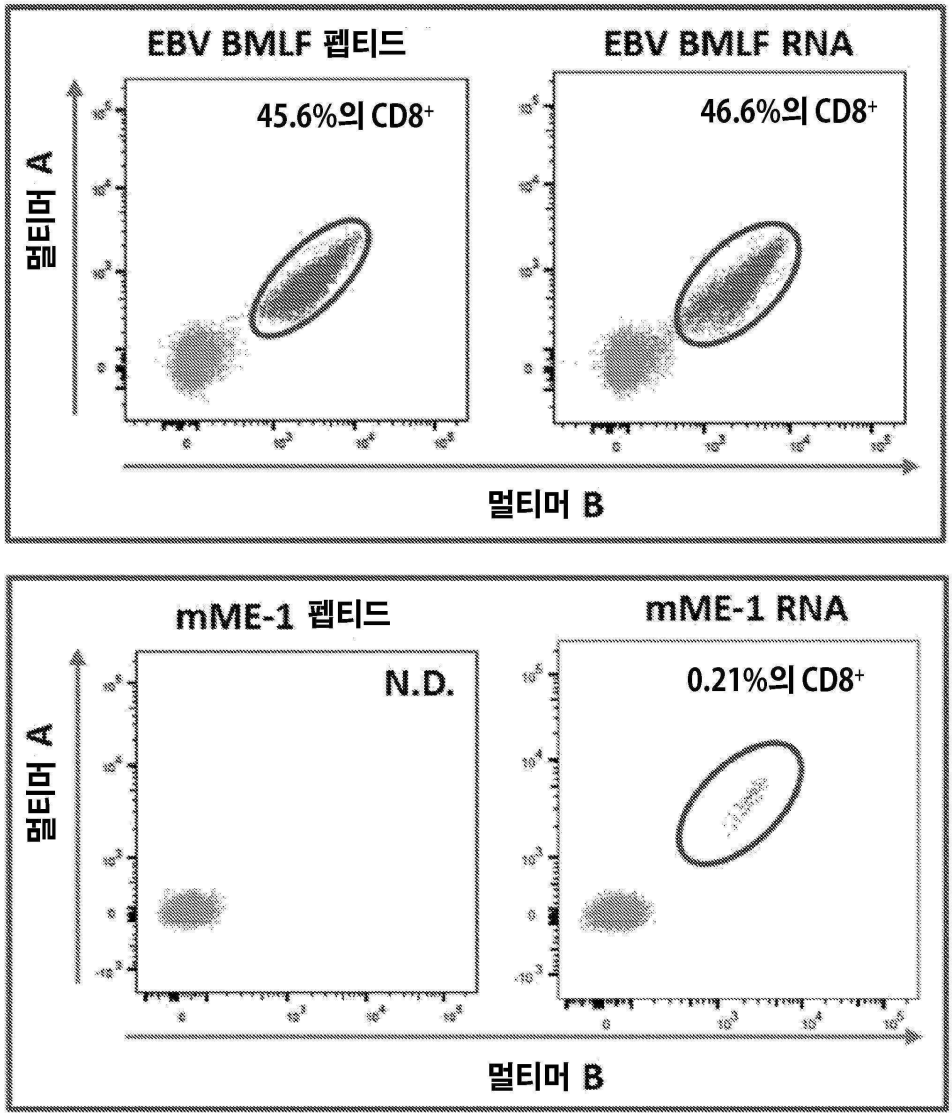
도면53


200
150
100
50
0
확장 배수
Ag 없음
DOM pep
PIN pep
GFP RNA
DOM RNA
PIN RNA

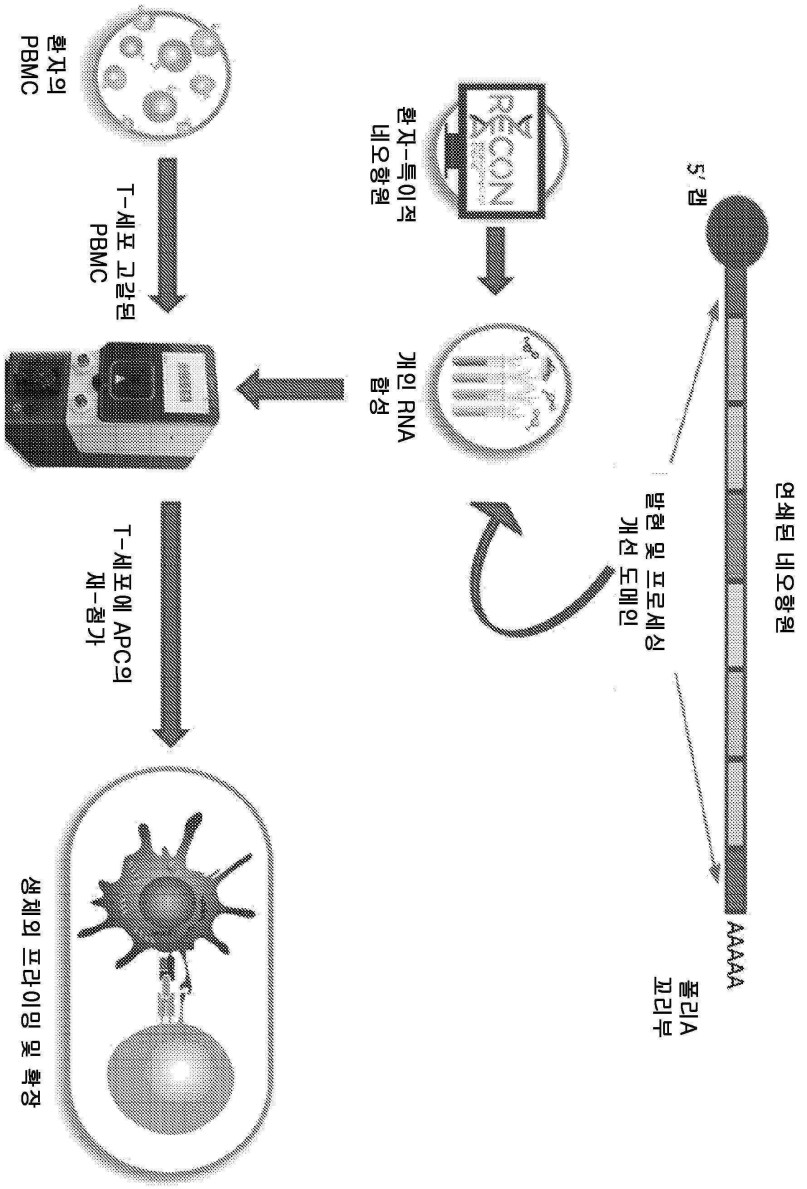
도면54


멀티머 양성 세포
0
1×10⁵
2×10⁵
3×10⁵
1×10⁶
2×10⁶
3×10⁶
4×10⁶
5×10⁶
P+DC
DOM PEP
Irr RNA
Irr RNA -CD3
DOM RNA
DOM RNA-CD3
MART-1
BMLF
YVL

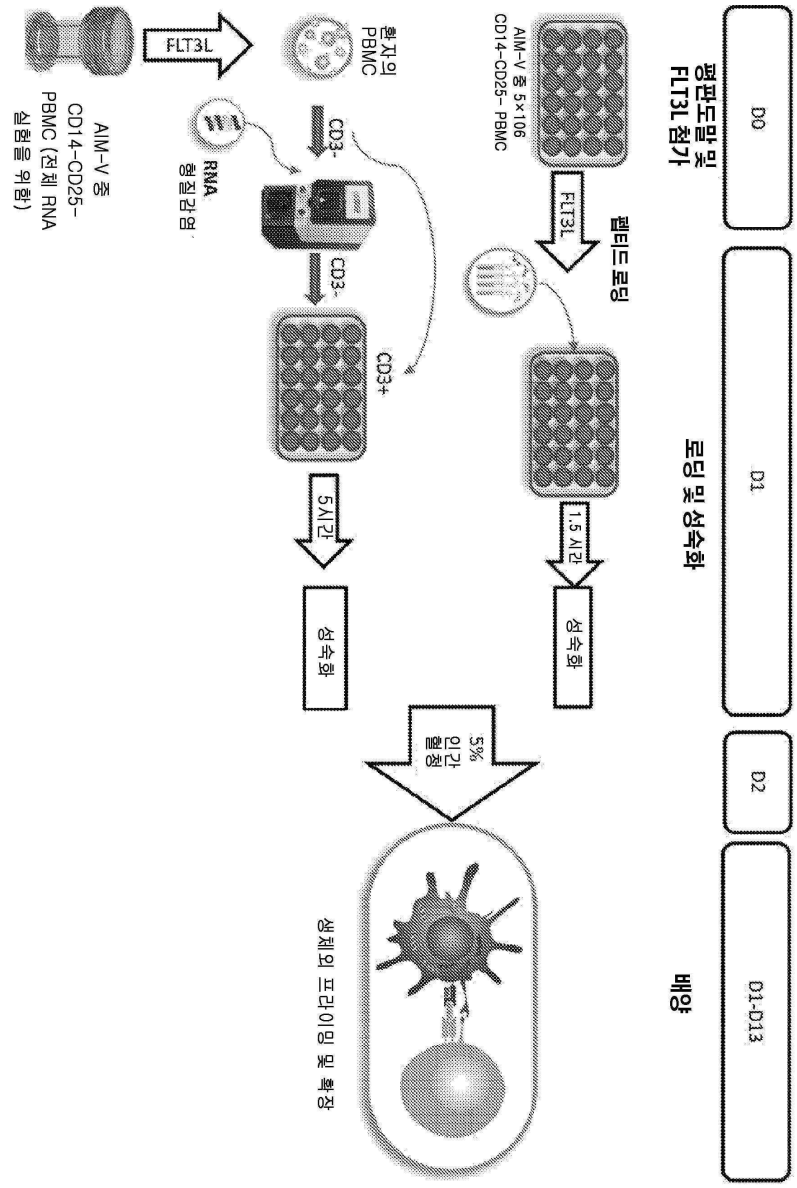
도면55


EBV BMLF 펩티드
45.6%의 CD8+
EBV BMLF RNA
46.6%의 CD8+
멀티머 A
멀티머 B
mME-1 펩티드
N.D.
mME-1 RNA
0.21%의 CD8+
멀티머 A
멀티머 B

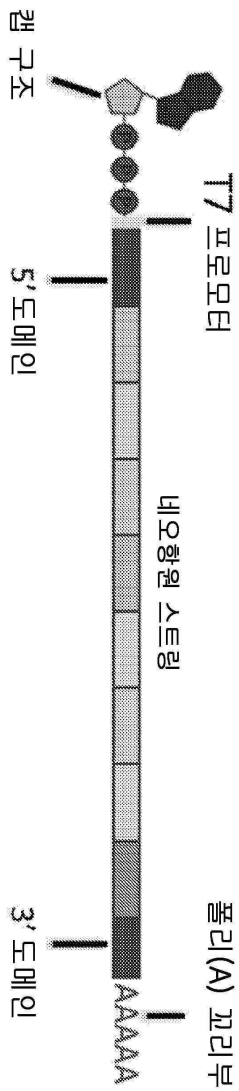
도면56a


환자의 PBMC
T-세포 고갈된 PBMC
환자-특이적 네오항원
개인 RNA 합성
T-세포에 APC의 재-첨가
생체외 프라이밍 및 확장
5' 캡
발현 및 프로세싱 개선 도메인
폴리A 꼬리부
AAAAA
변이된 네오항원

도면56b


D0
D1
D2
D1-D13
평판도말 및 FLT3L 첨가
로딩 및 성숙화
배양
AIM-V 중 5×106 CD14-CD25- PBMC
FLT3L
펠티드 로딩
1.5 시간
성숙화
환자의 PBMC
FLT3L
AIM-V 중 CD14-CD25- PBMC (전체 RNA 실험을 위함)
RNA 혈질감염
CD3-
CD3-
CD3+
5시간
성숙화
5% 인간 혈청
생체외 프라이밍 및 확장

도면57a



도면57b

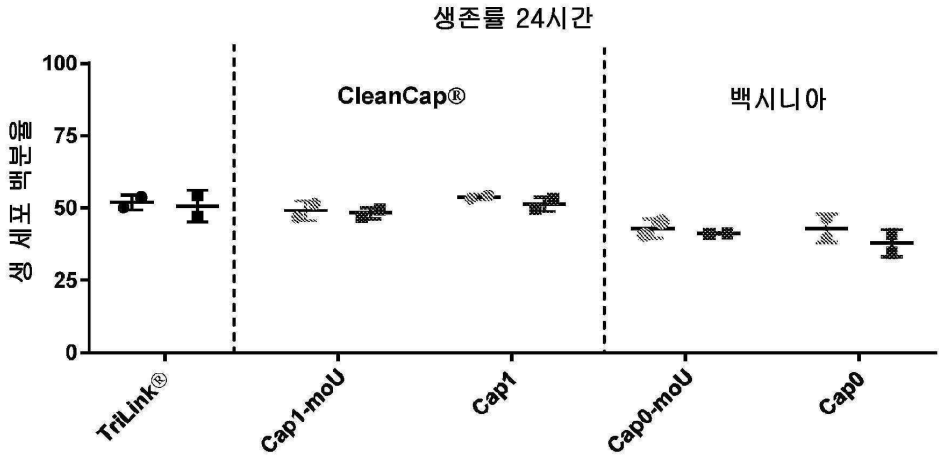


도면58a

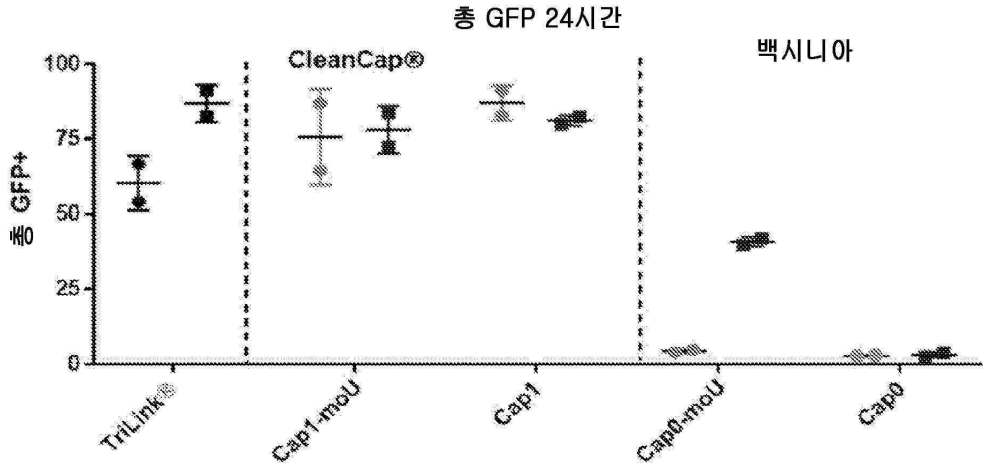
5' – ACTCACTATAGGNNNNN – 3'

5' – ACTCACTATAAGGNNNN – 3'

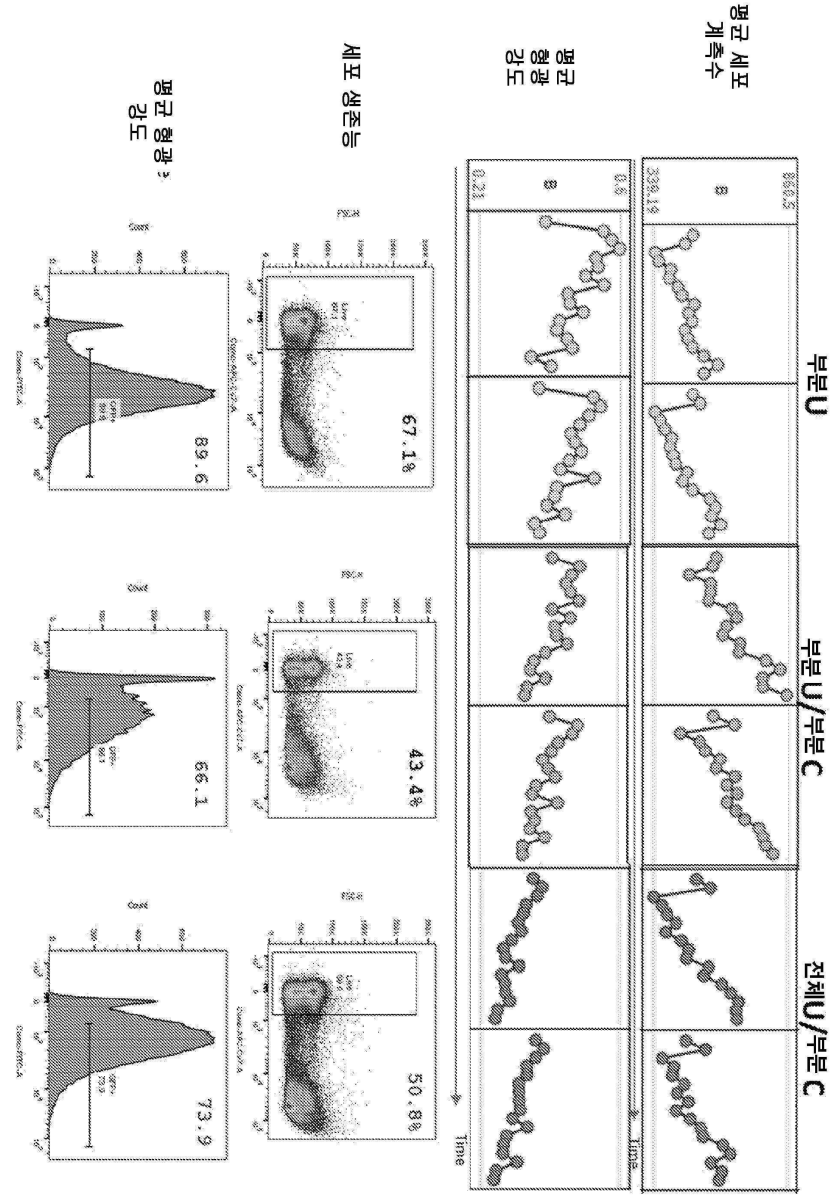
도면58b


생존률 24시간
생 세포 백분율
100
75
50
25
0
CleanCap®
백시니아
TriLink®
Cap1-moU
Cap1
Cap0-moU
Cap0

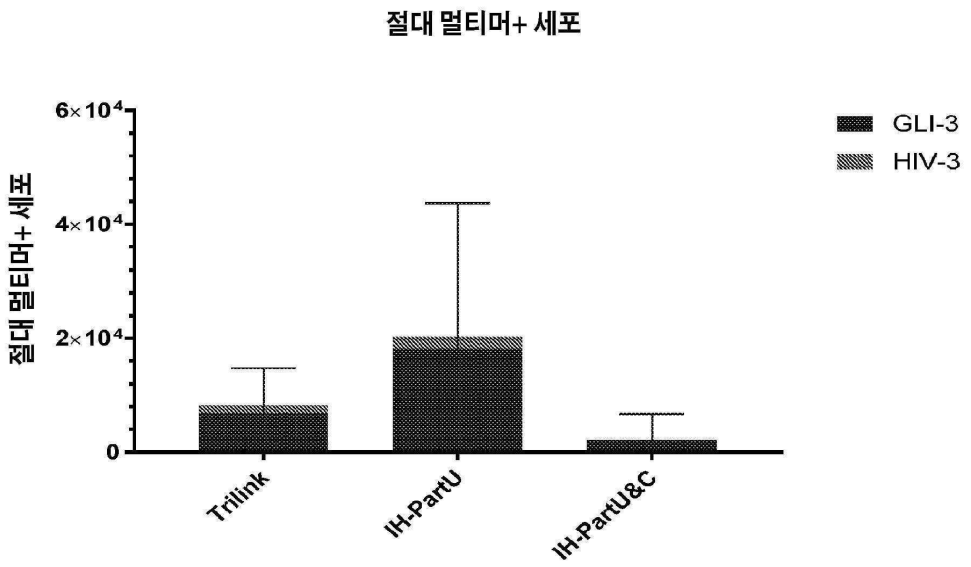
도면58c


총 GFP 24시간
총 GFP+
100
75
50
25
0
CleanCap®
백시니아
TriLink®
Cap1-moU
Cap1
Cap0-moU
Cap0

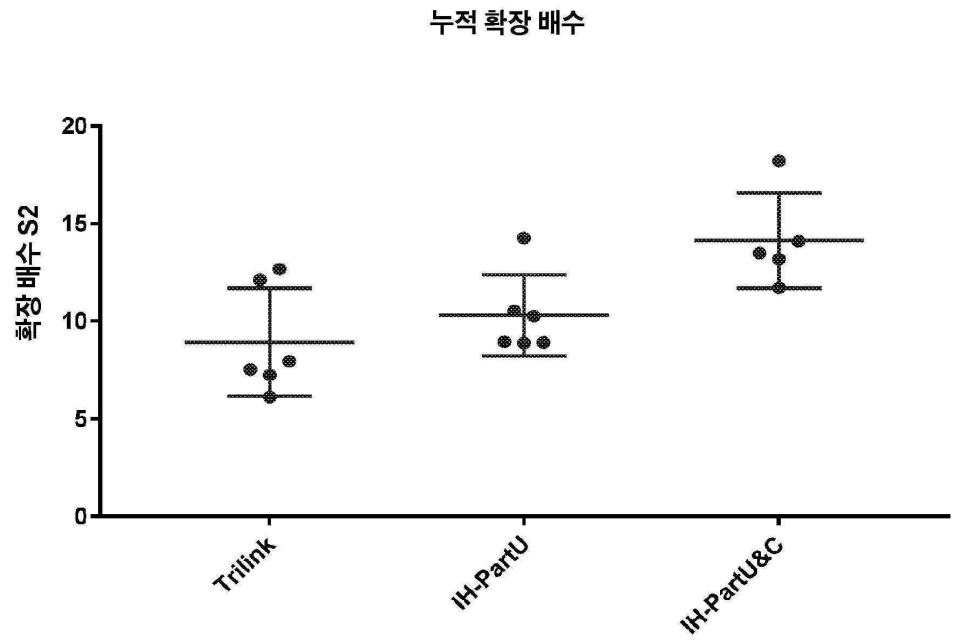
도면59a


부분U
부분U/부분C
전체U/부분C
평균 세포 계측수
평균 형광 강도
Time
세포 생존율
67.1%
43.4%
50.8%
평균 형광 강도
89.6
66.1
73.9

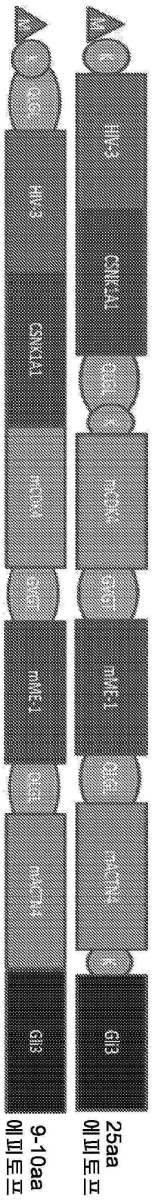
도면59b


절대 멀티머+ 세포
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
0
절대 멀티머+ 세포
GLI-3
HIV-3
Trilink
IH-PartU
IH-PartU&C

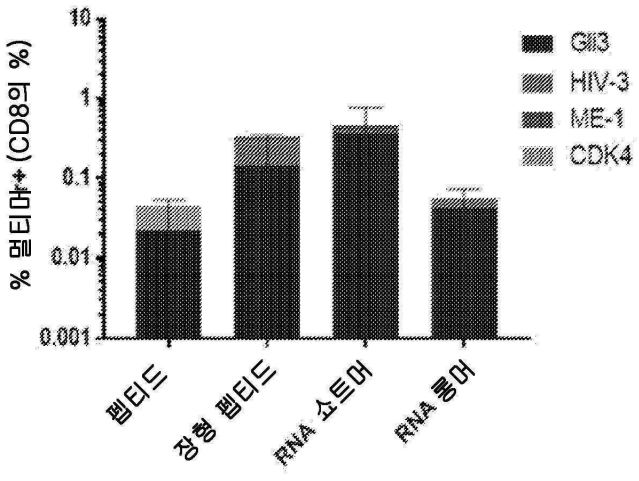
도면59c


누적 확장 배수
20
15
10
5
0
확장 배수 S2
Trilink
IH-PartU
IH-PartU&C

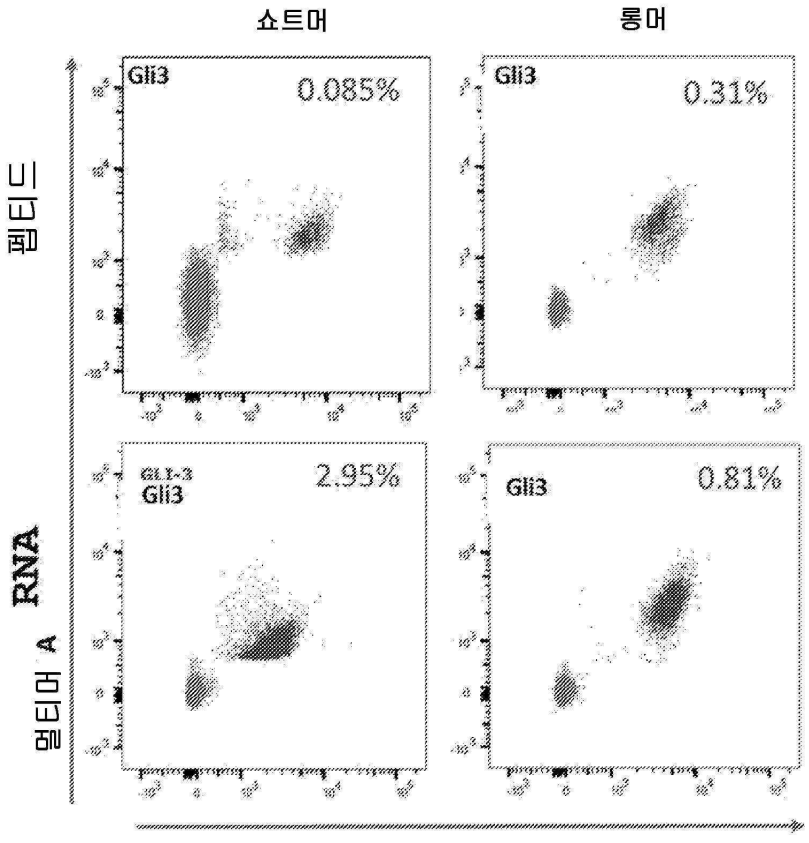
도면60a


HN-3
CSNK1A1
RHOA-1
mME-1
mHCTH-1
GII3
25aa
에피토프
HN-3
CSNK1A1
mCOM-1
mME-1
mHCTH-1
GII3
9-10aa
에피토프

도면60b


% 멀티머+ (CD8의 %)
10
1
0.1
0.01
0.001
Gli3
HIV-3
ME-1
CDK4
펩티드
정형 펩티드
RNA 쇼트머
RNA 롱머

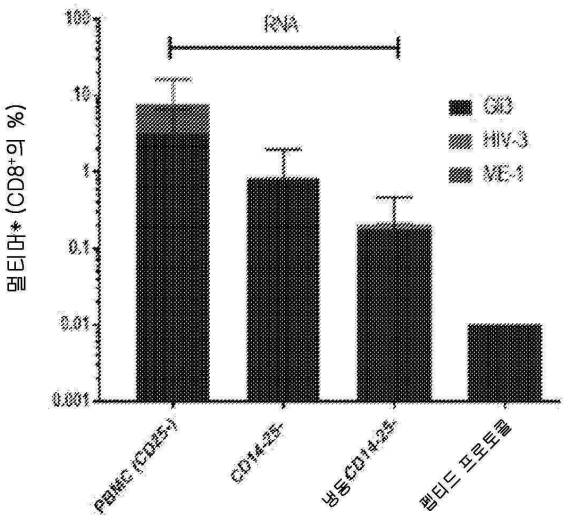
도면60c


쇼트머
롱머
펩티드
RNA
멀티머 A
Gli3
0.085%
Gli3
0.31%
Gli3
2.95%
Gli3
0.81%

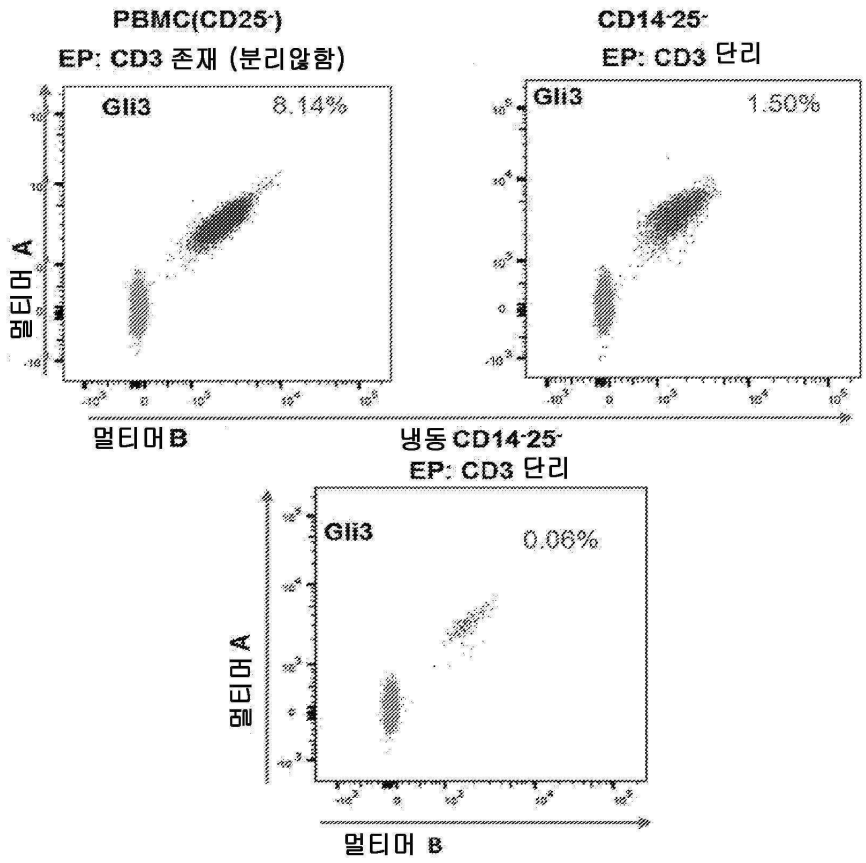
도면61a



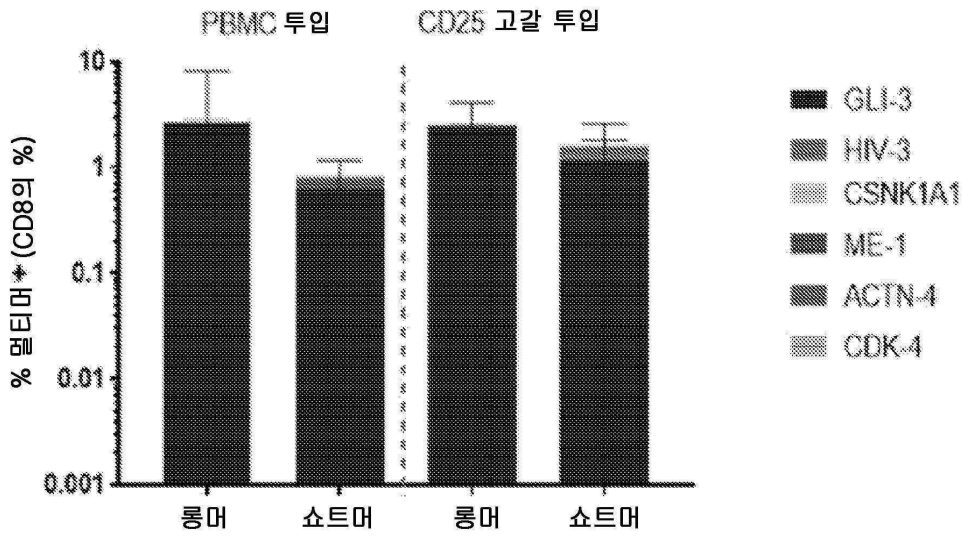
도면61b


RNA
GD
HIV-3
ME-1
멀티머+ (CD8+의 %)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
PBMC (CD25-)
CD14-25-
냉동 CD14-25-
멀티드 프로토콜

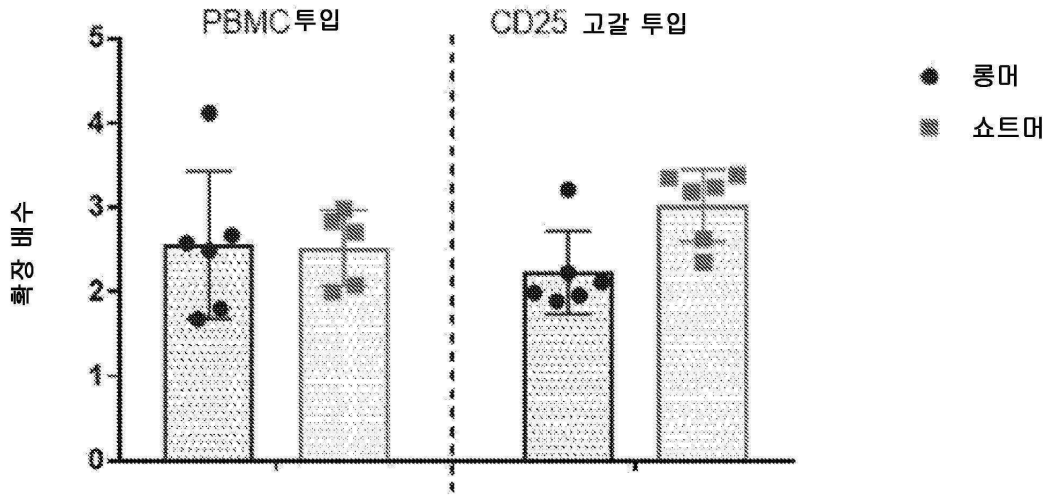
도면61c


PBMC(CD25-)
EP: CD3 존재 (분리않함)
Gli3
8.14%
CD14-25-
EP: CD3 단리
Gli3
1.50%
멀티머 A
멀티머 B
냉동 CD14-25-
EP: CD3 단리
Gli3
0.06%
멀티머 A
멀티머 B

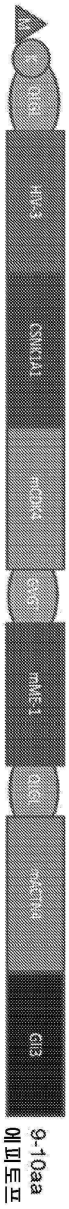
도면61d


PBMC 투입
CD25 고갈 투입
% 멀티머+ (CD8의 %)
10
1
0.1
0.01
0.001
롱머
쇼트머
롱머
쇼트머
GLI-3
HIV-3
CSNK1A1
ME-1
ACTN-4
CDK-4

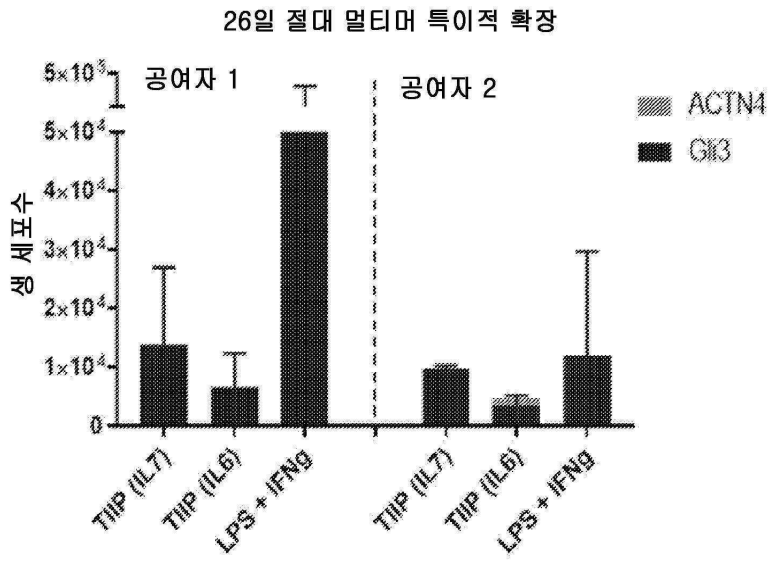
도면61e


PBMC투입
CD25 고갈 투입
확장 배수
5
4
3
2
1
0
롱머
쇼트머

도면62a



도면62b

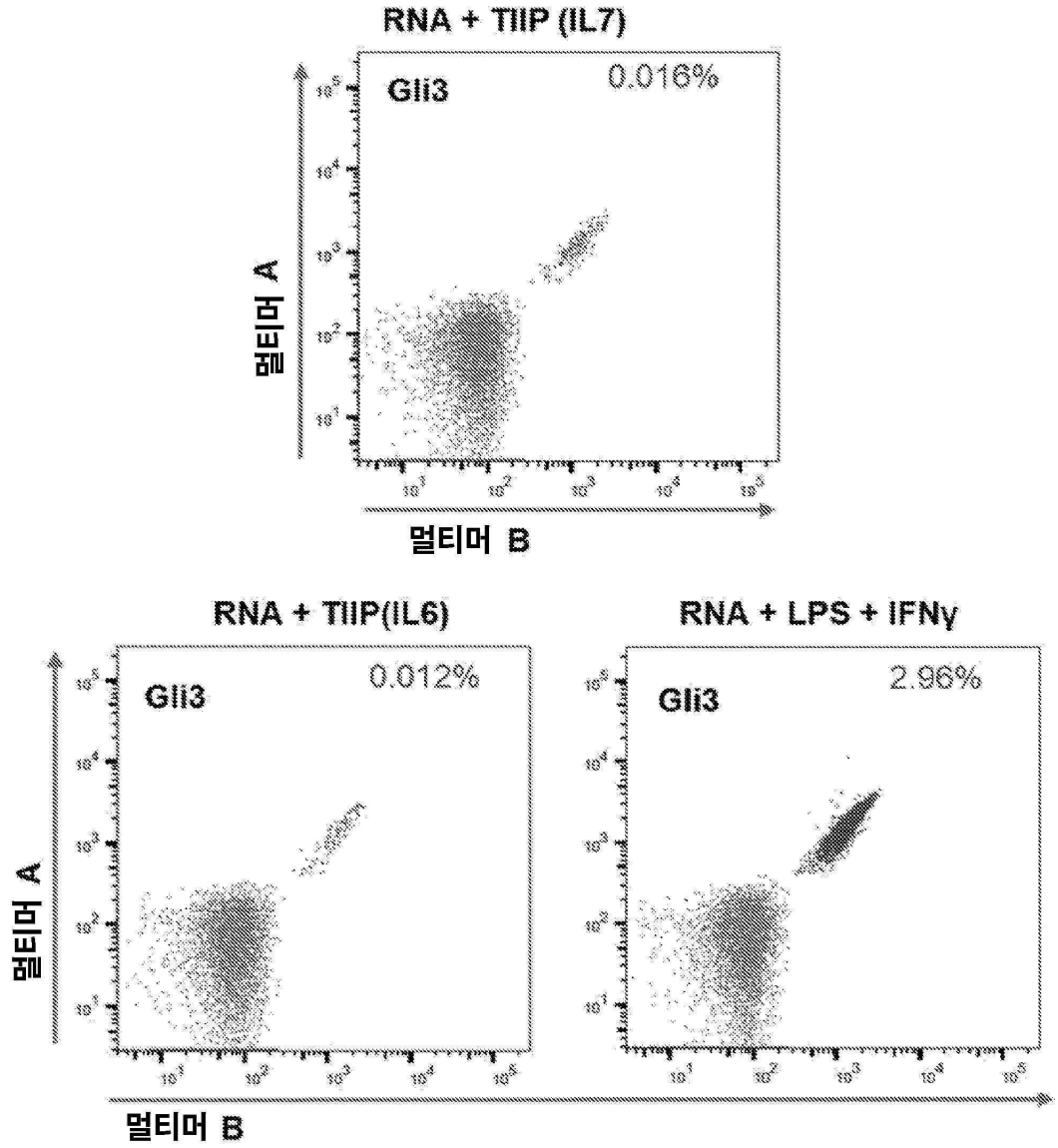


도면62c

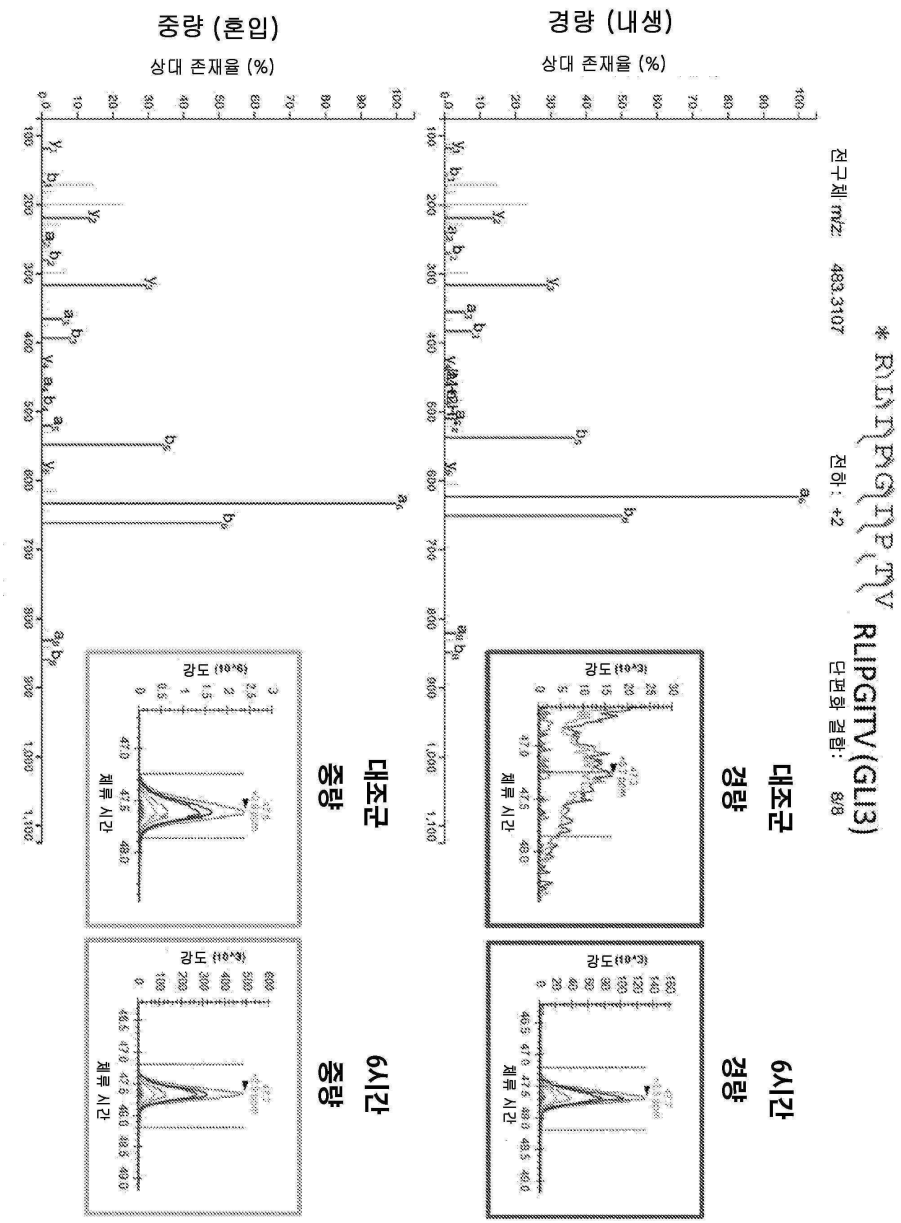
Gli3 히트율

Mat Mix	공여자 1	공여자 2
TIIP(IL7)	100%	33%
TIIP(IL6)	100%	67%
LPS+IFNγ	100%	100%

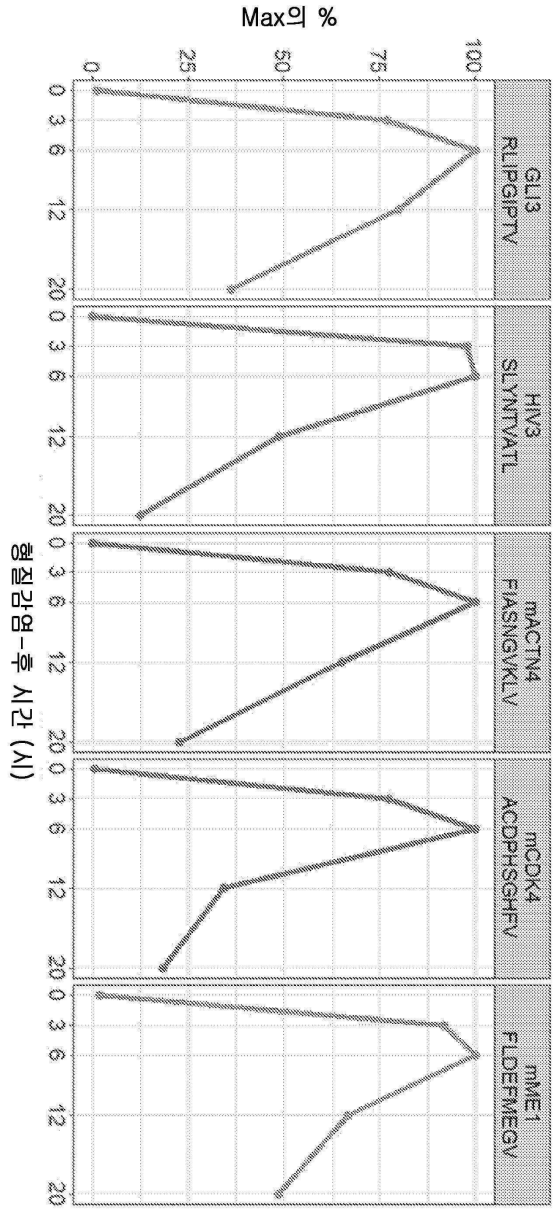
도면62d


RNA + TIIP (IL7)
Gli3
0.016%
멀티머 A
멀티머 B
RNA + TIIP(IL6)
Gli3
0.012%
RNA + LPS + IFNγ
Gli3
2.96%
멀티머 A
멀티머 B

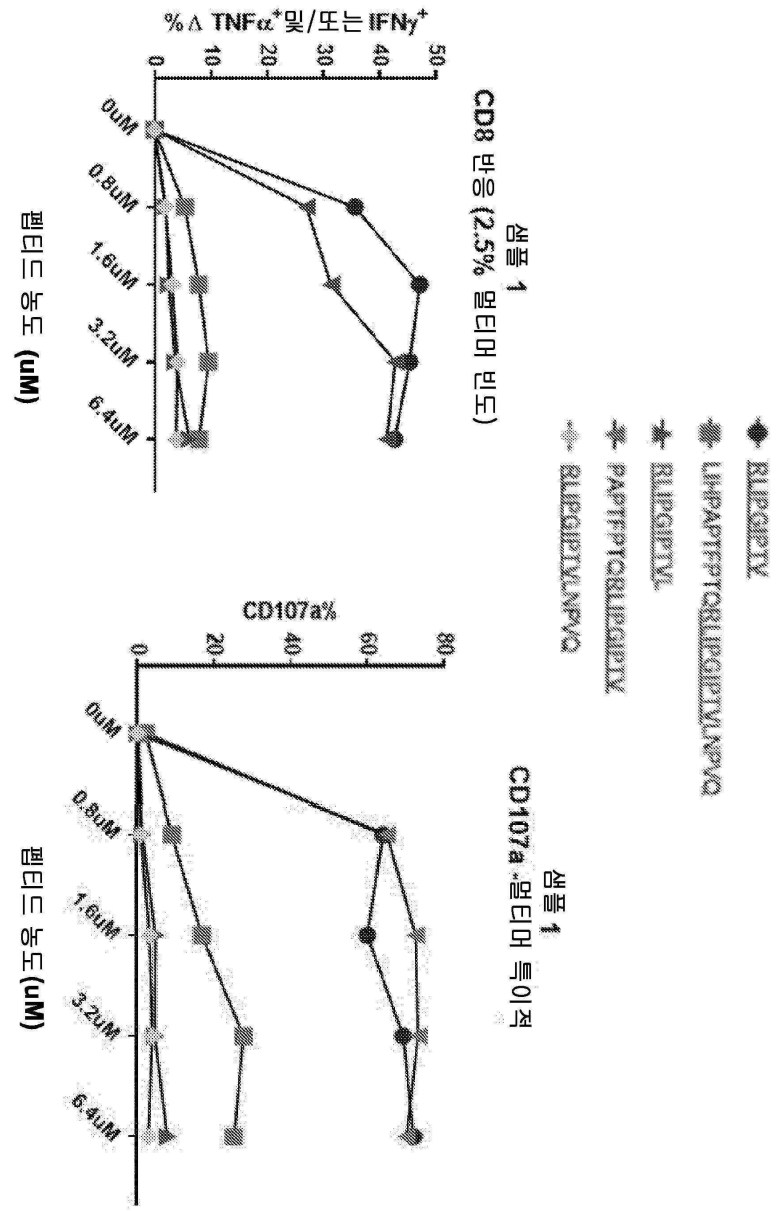
도면63a


* RLIPGITV(GLI3)
전구체 m/z: 483.3107
전하: +2
단편화 결합: 8/8
경량 (내생)
상대 존재율 (%)
중량 (혼입)
상대 존재율 (%)
대조군
경량
6시간
경량
대조군
중량
6시간
중량
강도
체류 시간

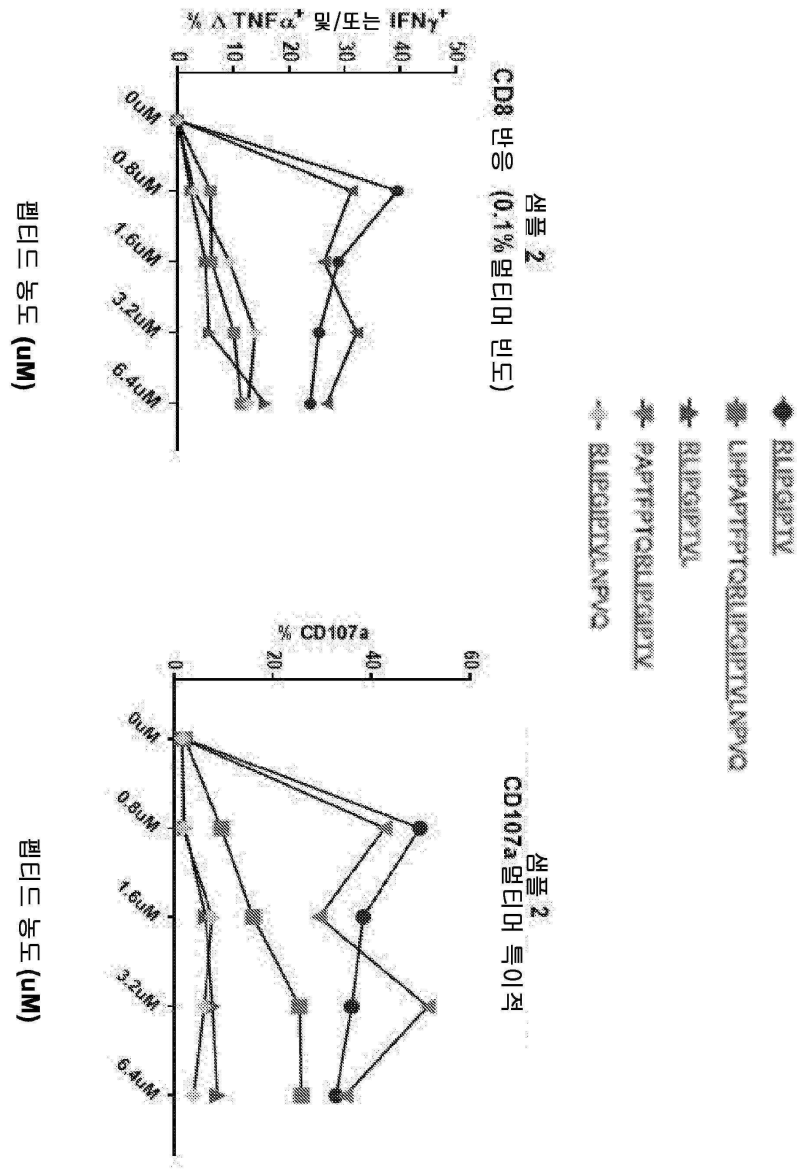
도면63b


Max의 %
0
25
50
75
100
GLI3
RLIPGIPTV
HIV3
SLYNTVATL
mACTN4
FIASNGVKLV
mCDK4
ACDPHSGHFV
mME1
FLDEFMEGV
0
3
6
12
20
용질감염-후 시간 (시)

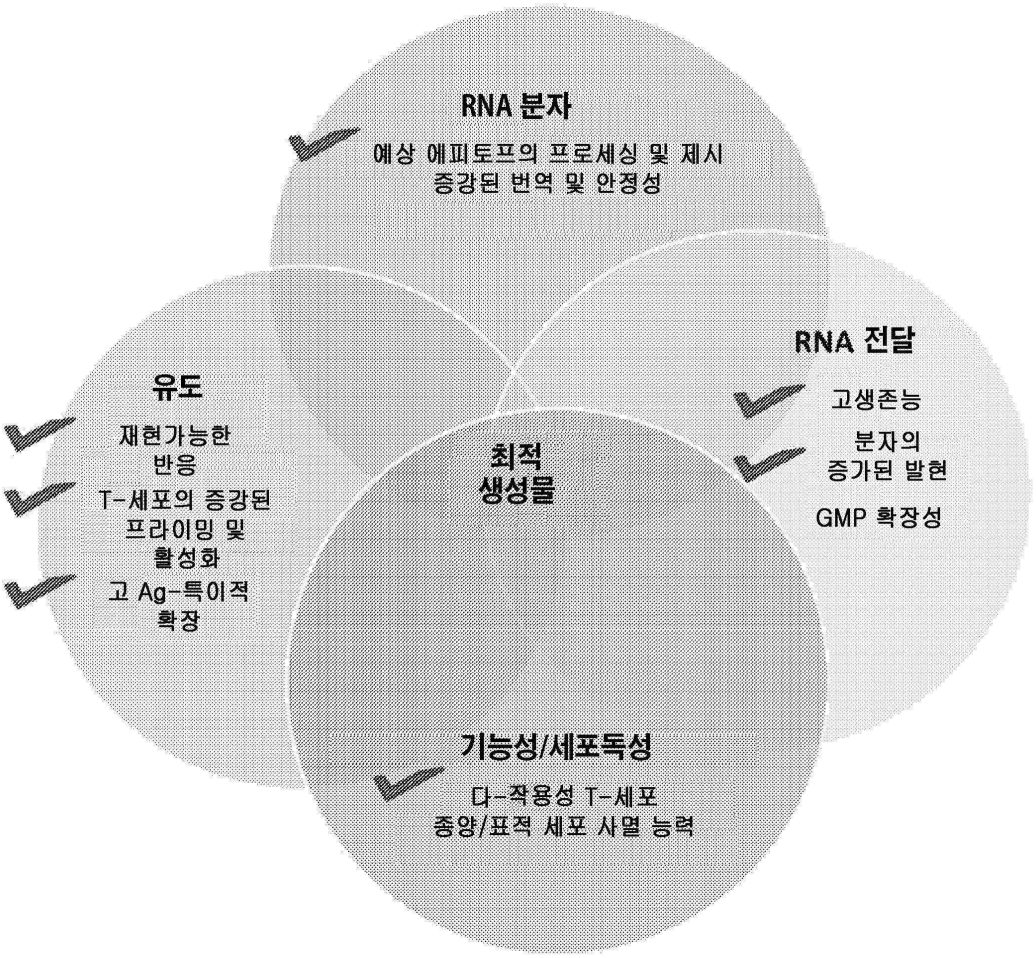
도면64a


CD8 반응 (2.5% 멀티머 비드)
샘플 1
% Δ TNFα+ 및/또는 IFNγ+
0
10
20
30
40
50
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
펩티드 농도 (uM)
CD107a 멀티머 늘이기
샘플 1
CD107a+
CD107a%
0
20
40
60
80
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
펩티드 농도 (uM)
RLPGAATAL
LMWAPTFGTRLIIDGLLPTVAPVG
RLPGAATAL
AAPTFGTRLIIDGLLPTVAPVG
RLPGAATALVAPVG
RLPGAATAL

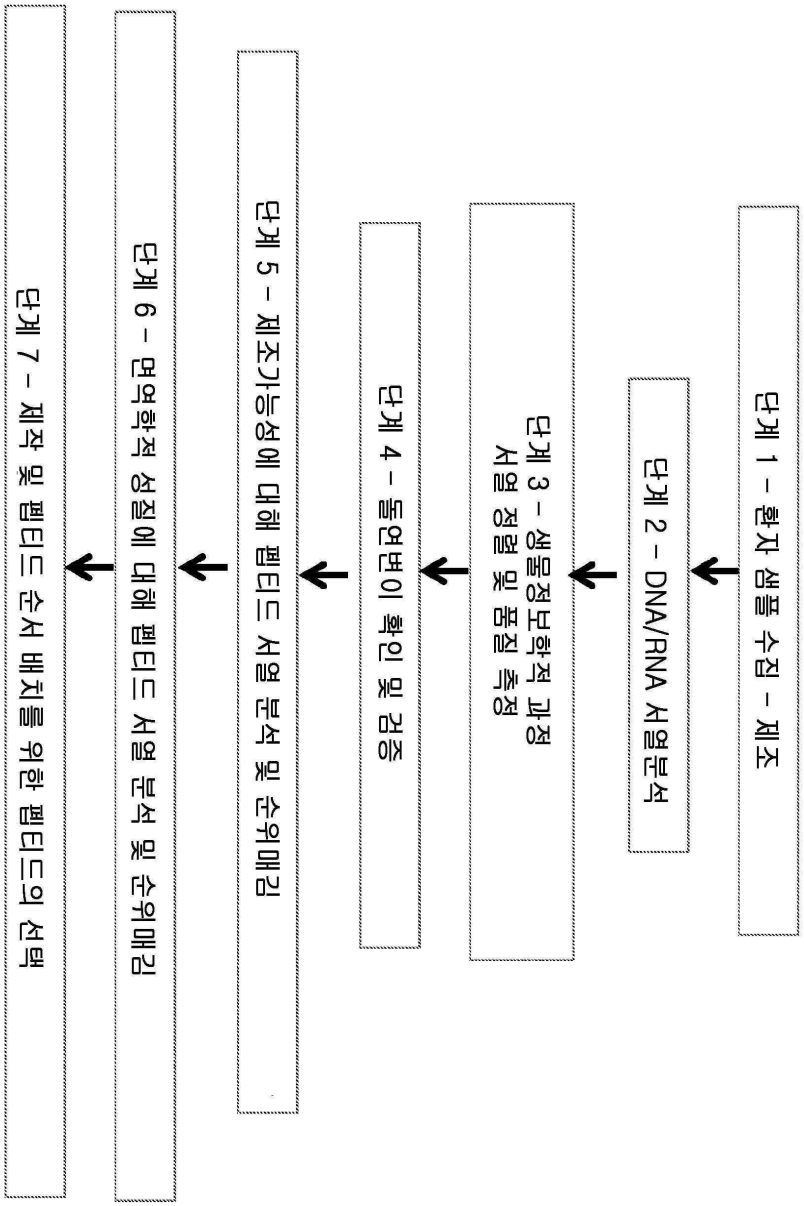
도면64b


CD8 반응 (0.1% 멀티머 바도)
샘플 2
% ΔTNFα+ 및/또는 IFNγ+
0
10
20
30
40
50
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
펩타이드 농도 (uM)
CD107a 멀티머 특이적
샘플 2
% CD107a
0
20
40
60
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
펩타이드 농도 (uM)
RLTGGTVL
LVPAPTGTRLIFCDLPTVLNPVL
RLTGGTVL
PVPTPGTRLIFCDLPTVL
CVPVLVTGDRLR

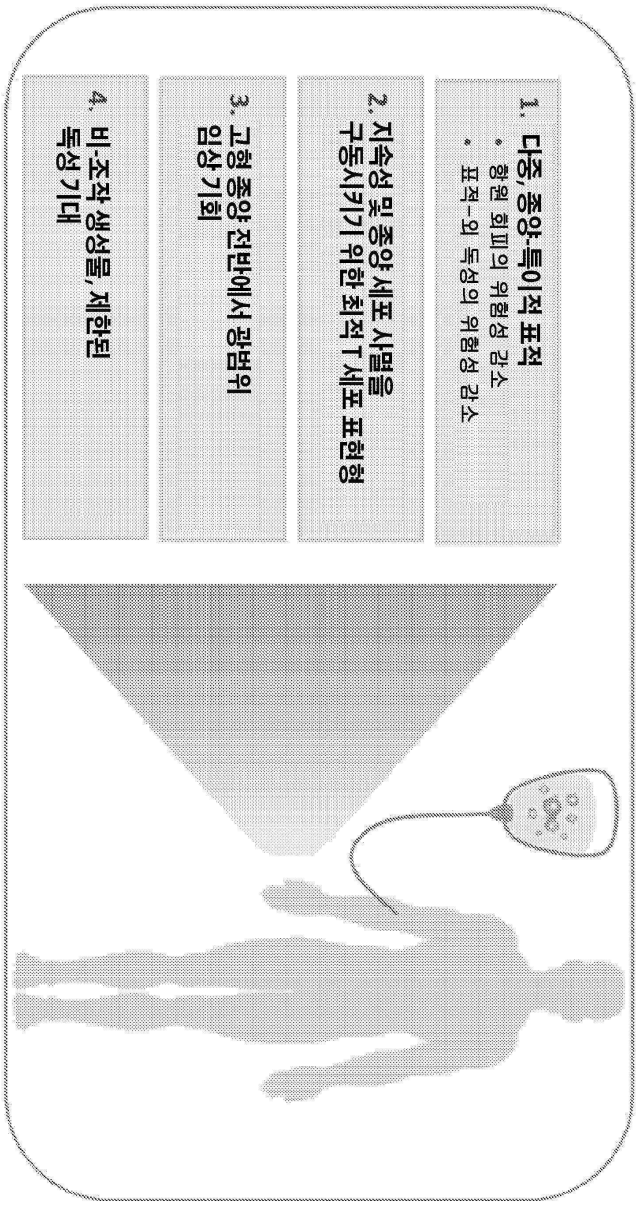
도면65


RNA 분자
예상 에피토프의 프로세싱 및 제시
증강된 번역 및 안정성
RNA 전달
고생존능
분자의
증가된 발현
GMP 확장성
유도
재현가능한
반응
T-세포의 증강된
프라이밍 및
활성화
고 Ag-특이적
확장
최적
생성물
기능성/세포독성
다-작용성 T-세포
종양/표적 세포 사멸 능력

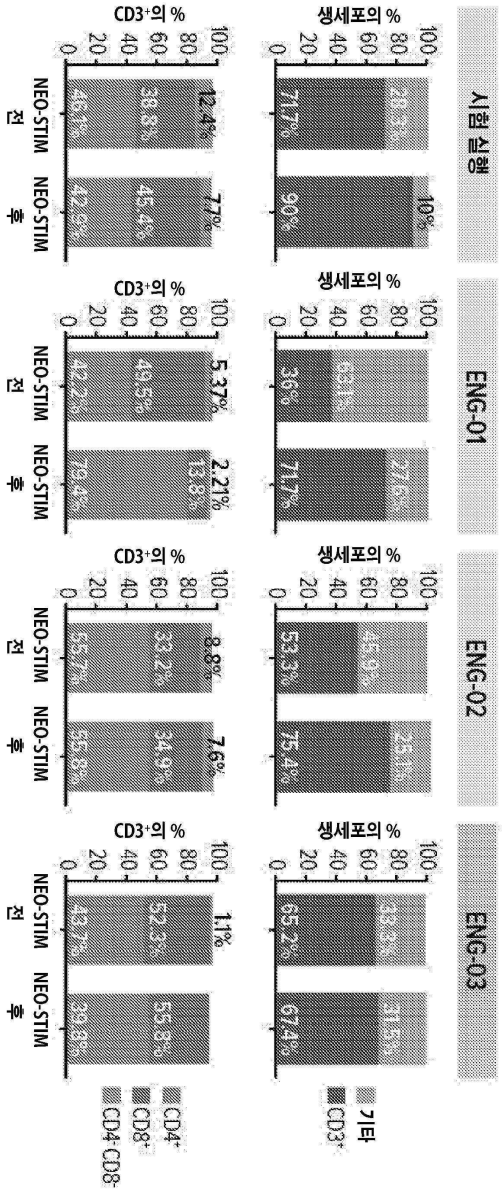
도면66


단계 1 – 환자 샘플 수집 – 제조
단계 2 – DNA/RNA 서열분석
단계 3 – 생물정보학적 과정
서열 정렬 및 품질 측정
단계 4 – 돌연변이 확인 및 검증
단계 5 – 제조가능성에 대해 펩티드 서열 분석 및 순위매김
단계 6 – 면역학적 성질에 대해 펩티드 서열 분석 및 순위매김
단계 7 – 제작 및 펩티드 순서 배치를 위한 펩티드의 선택

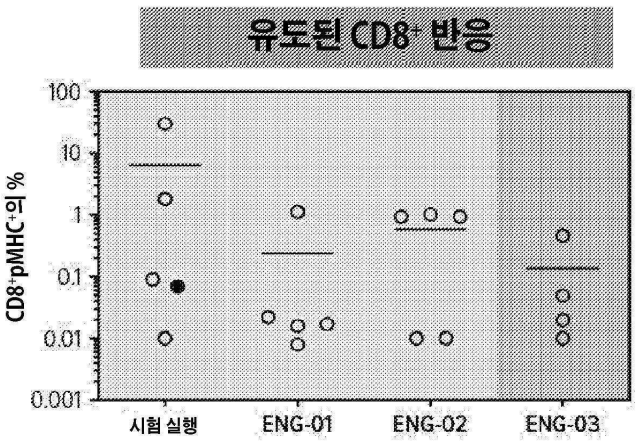
도면67


1. 다중, 종양-특이적 표적
• 항원 회피의 위험성 감소
• 표적-외 독성의 위험성 감소
2. 지속성 및 종양 세포 사멸을
구동시키기 위한 최적 T 세포 표현형
3. 고형 종양 전반에서 광범위
임상 기회
4. 비-조작 생성물, 제한된
독성 기대

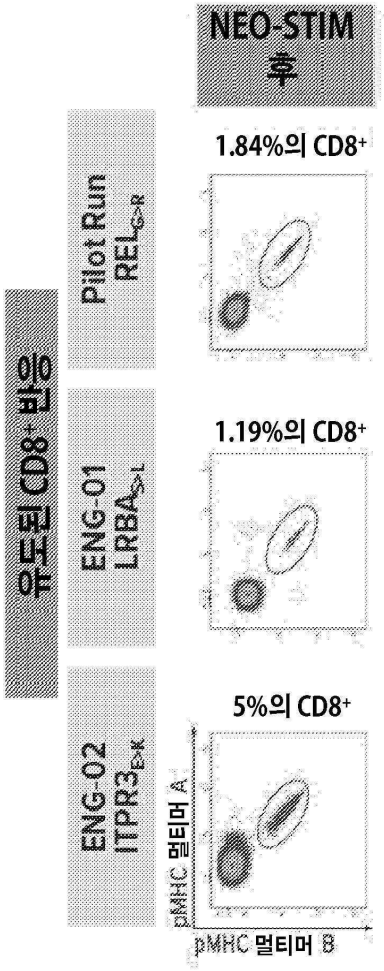
도면68


시험 실행
ENG-01
ENG-02
ENG-03
생세포의 %
CD3+의 %
NEO-STIM
전
후
12.4%
77%
5.37%
2.21%
8.8%
7.6%
1.1%
CD4+
CD8+
CD4+CD8-
기타
CD3+

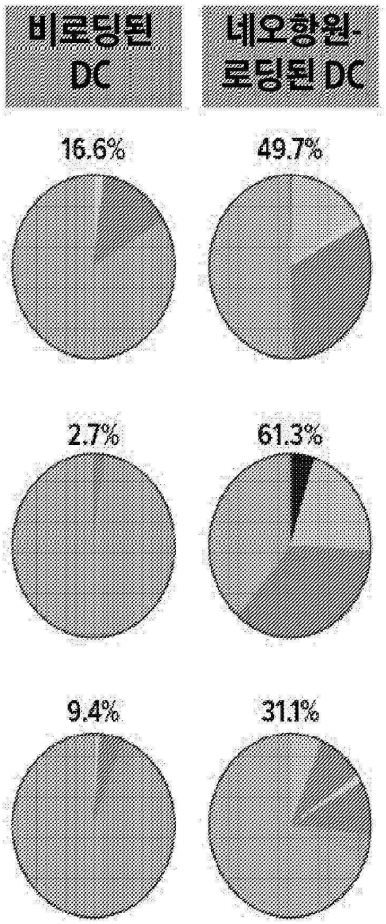
도면69a


유도된 CD8+ 반응
CD8+pMHC+의 %
100
10
1
0.1
0.01
0.001
시험 실행
ENG-01
ENG-02
ENG-03

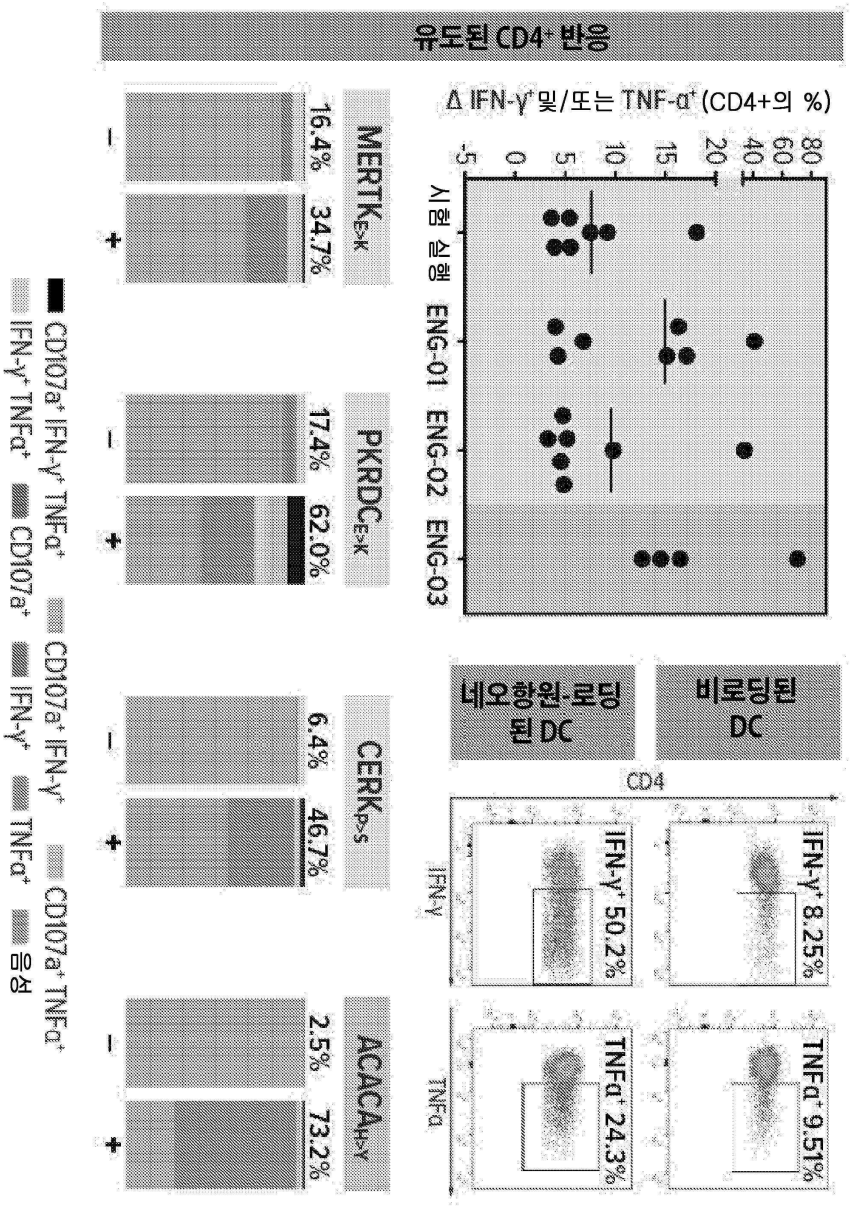
도면69b


NEO-STIM 후
1.84%의 CD8+
Pilot Run REL G>R
1.19%의 CD8+
ENG-01 LRBA S>L
5%의 CD8+
ENG-02 ITPR3 E>K
pMHC 멀티머 A
pMHC 멀티머 B
이동된 CD8+ 뷰

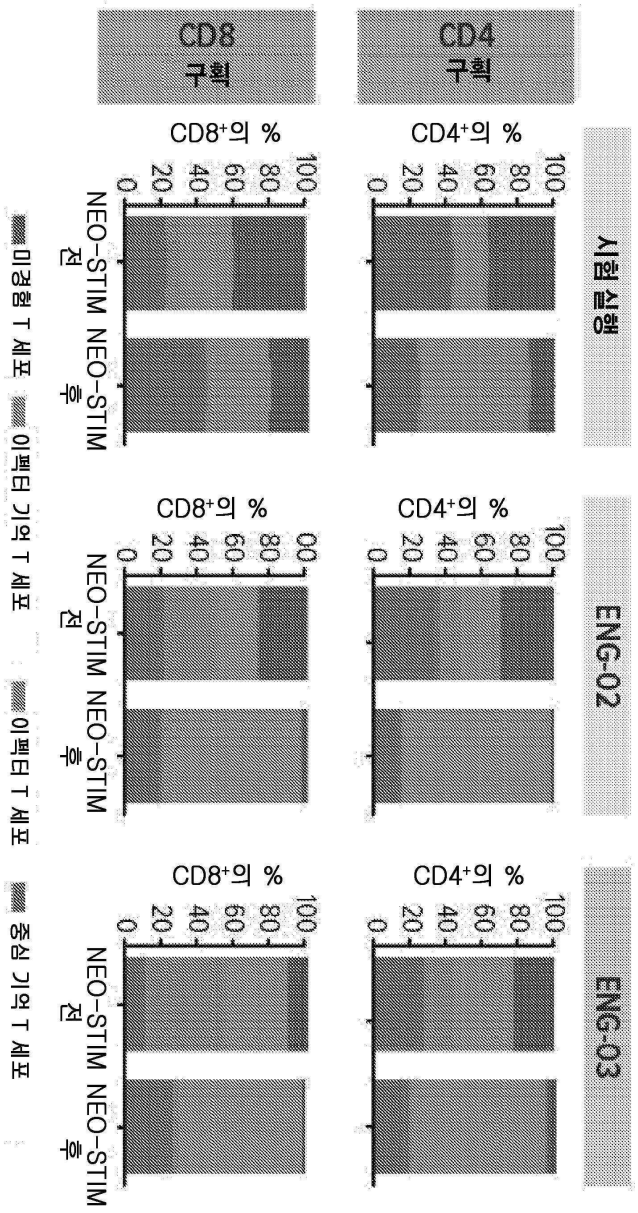
도면69c



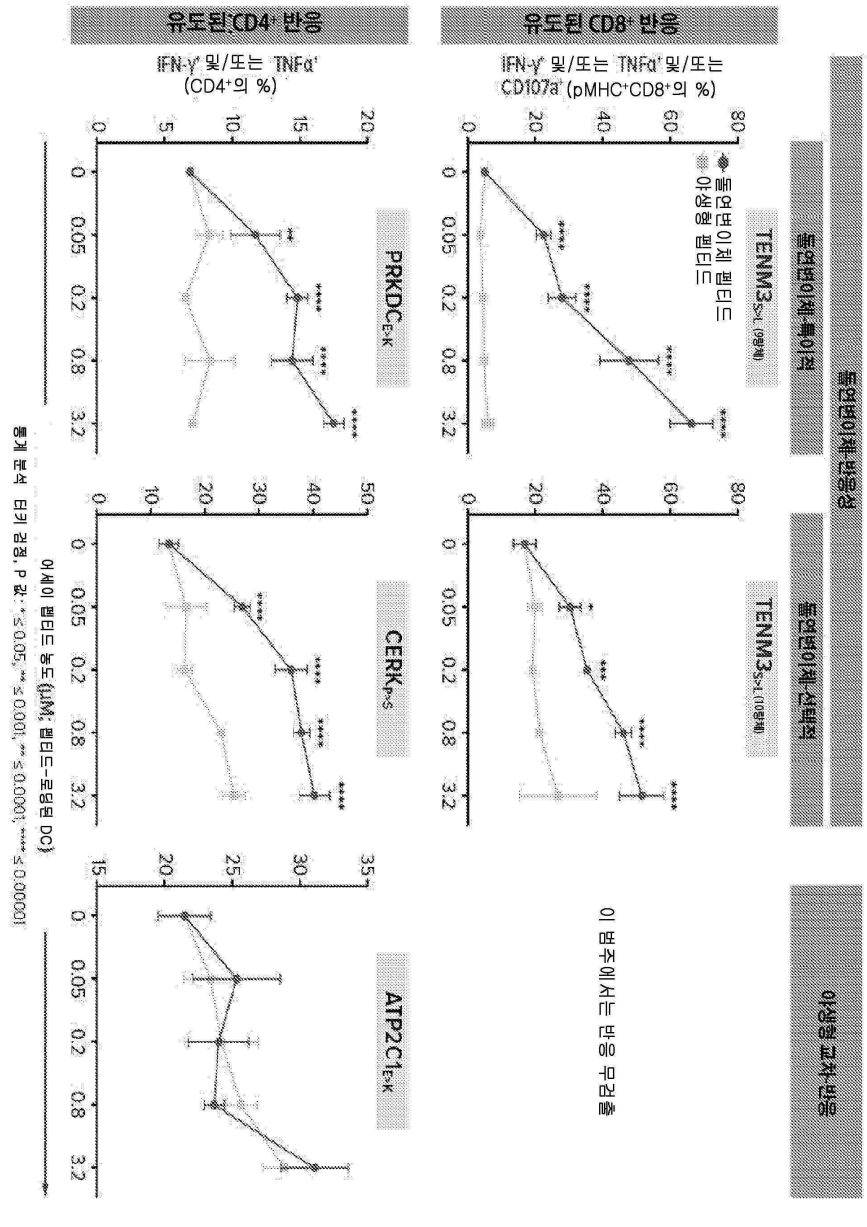
도면70


유도된 CD4+ 반응
Δ IFN-γ+ 및/또는 TNF-α+ (CD4+의 %)
시험 실행
ENG-01
ENG-02
ENG-03
비로딩된 DC
네오항원-로딩된 DC
CD4
IFN-γ
TNFα
IFN-γ+ 8.25%
IFN-γ+ 50.2%
TNFα+ 9.51%
TNFα+ 24.3%
MERTKE>K
PKRDCE>K
CERKP>S
ACACAH>Y
16.4%
34.7%
17.4%
62.0%
6.4%
46.7%
2.5%
73.2%
CD107a+ IFN-γ+ TNFα+
IFN-γ+ TNFα+
CD107a+
CD107a+ IFN-γ+
IFN-γ+
CD107a+ TNFα+
TNFα+
음성

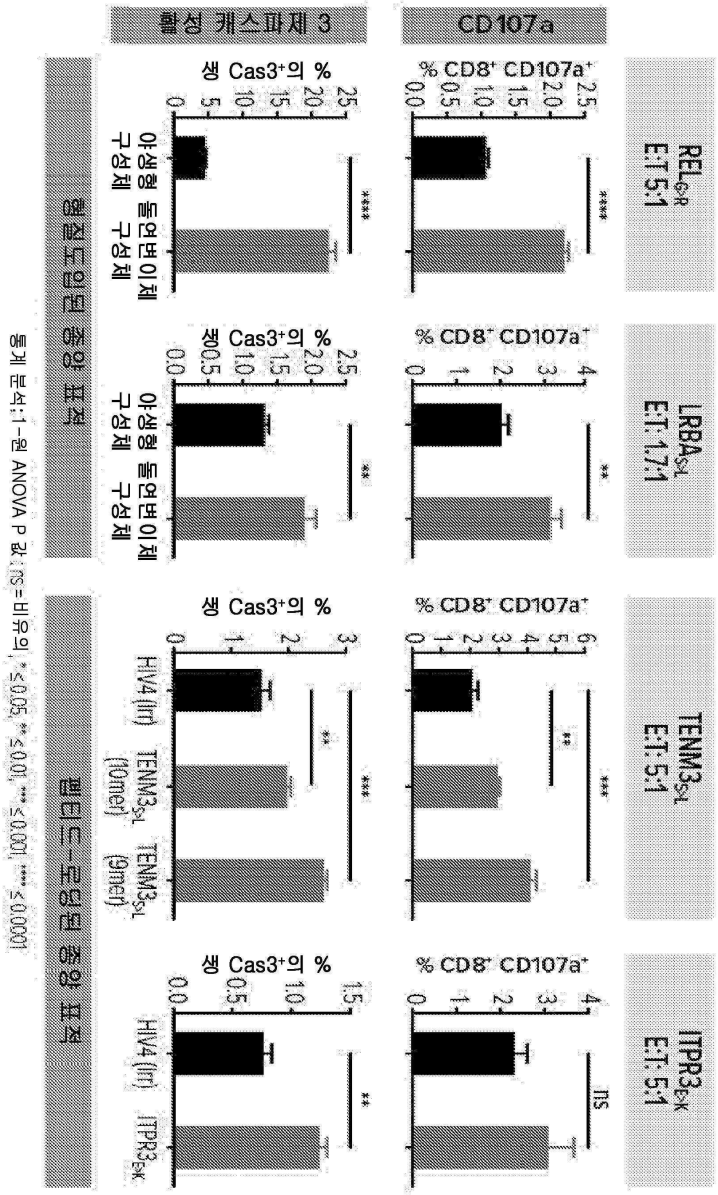
도면71


CD8
구획
CD4
구획
CD8+의 %
CD4+의 %
0
20
40
60
80
100
NEO-STIM 전
NEO-STIM 후
시험실행
ENG-02
ENG-03
미경험 T 세포
이펙터 기억 T 세포
이펙터 T 세포
중심 기억 T 세포

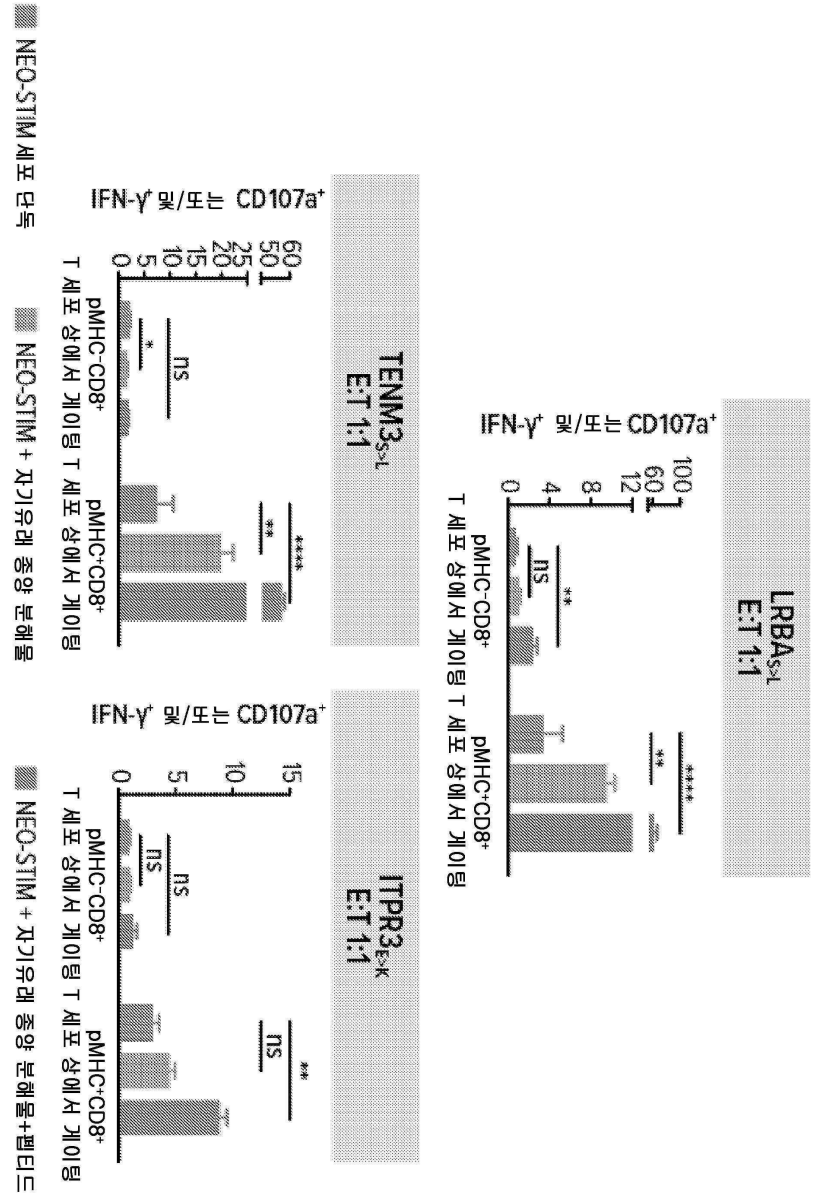
도면72


돌연변이체 반응성
돌연변이체 특이적
돌연변이체-선택적
야생형 교차-반응
유도된 CD8+ 반응
유도된 CD4+ 반응
IFN-γ+ 및/또는 TNFα+ 및/또는 CD107a+ (pMHC+CD8+의 %)
IFN-γ+ 및/또는 TNFα+ (CD4+의 %)
돌연변이체 펩티드
야생형 펩티드
TENM3 (9량체)
TENM3 (10량체)
PRKDC
CERK
ATP2C1
이 범주에서는 반응 무검출
어세이 펩티드 농도 (μM; 펩티드-로딩된 DC)
통계 분석: 타키 검정, P 값: * ≤ 0.05, ** ≤ 0.001, *** ≤ 0.0001, **** ≤ 0.00001

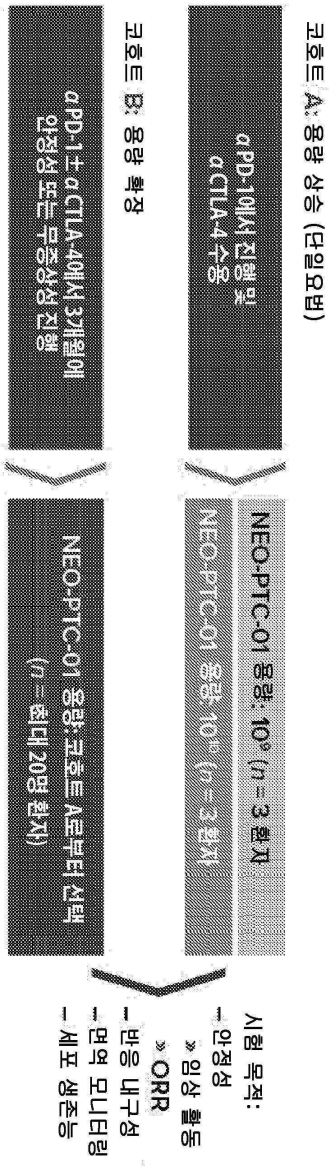
도면73


CD107a
활성 캐스파제 3
RELSR E:T 5:1
LRBAS-L E:T: 1.7:1
TENM3S-L E:T: 5:1
ITPR3E-K E:T: 5:1
% CD8+ CD107a+
생 Cas3+의 %
야생형 돌연변이체 구성체
HIV4 (irr)
TENM3S-L (10mer)
TENM3S-L (9mer)
ITPR3E-K
ns
펩티드-로딩된 중앙 표적
펩티드-로딩되지 않은 중앙 표적
통계 분석: 1-원 ANOVA P 값: ns = 비유의, * ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001

도면74


LRBA S>L
E:T 1:1
IFN-γ+ 및/또는 CD107a+
pMHC-CD8+ T 세포 상에서 게이팅
pMHC+CD8+ T 세포 상에서 게이팅
TENM3 S>L
E:T 1:1
ITPR3 E>K
E:T 1:1
NEO-STIM 세포 단독
NEO-STIM + 자기유래 종양 분해물
NEO-STIM + 자기유래 종양 분해물+펩티드

도면75


코호트 A: 용량 상승 (단일요법)
αPD-1에서진행된 αCTLA-4 수술
NEO-PTC-01 용량: 10^9 (n = 3 환자)
NEO-PTC-01 용량: 10^{10} (n = 3 환자)
코호트 B: 용량 확장
αPD-1 + αCTLA-4에서 3개월에 안정성 또는 부분반응 진행
NEO-PTC-01 용량: 코호트 A로부터 선택 (n = 최대 20명 환자)
시험 목적:
– 안전성
» 임상 활동
» ORR
– 반응 내구성
– 면역 모니터링
– 세포 생존율